МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И РАЗНООБРАЗИЯ ДЕТРИТНЫХ ПИЩЕВЫХ СЕТЕЙ



Москва

2003

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И РАЗНООБРАЗИЯ ДЕТРИТНЫХ ПИЩЕВЫХ СЕТЕЙ

Методическое руководство

Москва

2003

УДК 592+631.4

Методы оценки структуры, функционнрования и разнообразия детритных пищевых сетей. Методическое руководство / под редакцией А.Д. Покаржевского, К.Б. Гонгальского и А.С. Зайцева – М.: Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 2003. 100 с. – Табл. 7, илл.12, библ. 76.

В методическом руководстве собраны протоколы методов апробированных в ходе исследований структуры, функционирования и биоразиообразия детритных пищевых сетей в разных природных зонах и при различных видах антропогенной нагрузки. Сборник предназначен для специалистов в области почвеиной биологии, биогеографии и географии почв, рационального природопользования, экотоксикологов, студентов специализирующихся в области почвенной биологии, географии и почвоведеиия. Издание руководства профинансировано грантами EST.CLG.978832 и РФФИ 03-05-64127.

Investigation methods of structure, functioning and diversity of detrital food-webs. Editors A.D. Pokarzhevskii, K.B. Gongalsky and A.S. Zaitsev – Moscow: Institute of Ecology and Evolution RAS. 2003. 100 pp.

The guideline comprises protocols tested in the studies of structure, functioning and diversity of detrital food-webs in various nature conditions and under untropogenic pressure. The book is focused on the specialists on soil biology, soil geography, soil ecotoxicology and biogeography, nature use management, and graduate students in those areas.
The issue is supported by the grants EST.CLG.978832 and RFBR 03-05-64127 and.

ISBN 5 - 87484 - 4

АВТОРЫ

Бобров А.А.

Факультет почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Бутовский Р.О.

Институт охраны природы и заповедного дела Министерства природных ресурсов РФ

Викторов А.Г.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Гонгальский К.Б.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Зайцев А.С.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Криволуцкий Д.А.

Институт паразитологии РАН

Панченко И.А.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Покаржевский А.Д.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Савин Ф.А.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова

Солдатов М.С.

Географический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Филимонова Ж.В.

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Предполагаемые и прогнозируемые глобальные изменения климата Земли резко обострили интерес к изучению почвенной биоты не только как возможного индикатора таких изменений, но и как важнейшего компонента наземных экосистем, обеспечивающих их функционирование через циклы углерода, азота, фосфора и других элементов. Почва как трехфазная среда обитания является и наиболее заполненной системой внутри наземных экосистем в отношении ресурсов и факторов среды. Соответственно, ожидаемые изменения должны проявляться в почвенной биоте позже, чем в наземном компоненте экосистем. С другой стороны, почвам свойственно исключительное биоразнообразие населяющих их организмов, среди которых можно обнаружить своеобразные "биомаркеры раннего предупреждения" возможных изменений. Это биоразнообразие, включая биомаркеры, структурировано в почве не только и не столько в виде популяций отдельных видов, а в виде детритных пищевых сетей, существование которых во многом зависит от ресурсов элементов, незаменимых соединений, энергоносителей. Через эти сети реализуются основные потоки элементов и их соединений, разнообразие таких функциональных показателей почвенной биоты как энзиматическая активность, использование энергетических субстратов или питательных веществ, дыхание, восстановление или окисление неорганических соединений и т.д. Эти функциональные показатели наряду с изменениями в популяциях "биомаркеров", биоразнообразии и структуре детритных пищевых сетей также могут служить индикации глобальных изменений климата в почвах, так как определяются прямыми или косвенными эффектами деятельности организмов и их популяций, составляющих эти сети.

Корректность и валидность оценок изменений может опираться только на корректность используемых методов исследования, которая может быть проверена, в том числе и на собственном опыте, включая и опыт собственных ошибок. Поэтому, предлагая данное методическое руководство мы включили в него только те методы, которые или использовали и проверяли сами или, валидность которых подтверждена опытом многих исследователей. Несмотря на существование достаточно солидных методических пособий по полевым и экспериментальным методам почвенной биологии (Гиляров, Стриганова, 1975;

Хазиев, 1988; Schinner et al, 1994; Alef, Nannipieri, 1995) с протоколами выполнения тех или иных процедур в почвенно-биологических исследованиях, мы постарались вложить в это руководство в первую очередь выполнимые методы и, во-вторых, представить их в виде протоколов, как это делается в зарубежных методических изданиях. Эти методы являлись и являются руководящими в исследованиях по грантам NWO (Организации содействия научным исследованиям Нидерландов) N047-002-009, НАТО (ENVIR.LG 951366 и EST.CLG.978832) и грантов РФФИ № 99-04-48577 и 03-05-64127. Финансовая поддержка последнего гранта позволила опубликовать данное руководство.

Это руководство не могло появиться без плодотворных дискуссий с нашими зарубежными коллегами: профессорами К. Эдвардсом (C. Edwards, Ohio State University, USA), Т. Першоном (T. Persson, Sveriges Landsbruksuniversitet, Sweden), Н.М. Ван Страаленом (N.M. Van Straalen, Vrije Universiteit Amsterdam, The Netherlands), В. Волтерсом (V. Wolters, Justus Liebig Universitat, Germany), докторами М. Бергом (M. Berg, Vrije Universiteit Amsterdam, The Netherlands), Р. Куперманом (R. Kuperman, Geosites, USA), Й. Рёмбке (J. Römbke, ECT, Germany), М. Шове (M. Shauvat, Justus Liebig Universität, Germany). Приносим им искреннюю благодарность за дискуссии и представленную информацию о методах.

ПИЩЕВАЯ СЕТЬ И ЕЕ СТРУКТУРА

Прежде чем рассматривать различные методы исследования структуры, функционирования и биоразнообразия в детритной пищевой сети, стоит показать современные представления о структуре детритной пищевой сети и распределении биомасс ее компонентов в различных природных зонах.

Термин «трофический уровень» был введен Элтоном в 1927 году (Элтон, 1934), а термины «детритная пищевая цепь» и «детритная пищевая сеть» – в работах Ю. Одума в 50-е годы для обозначения пищевой цепи, исходным звеном которой было мертвое органическое вещество. Детритная пищевая цепь отличалась от пастбищной пищевой цепи, исходным звеном которой были живые растительные ткани.

Традиционно представление о детритной пищевой сети сложилось на основе представлений Линдемана, развитых затем Ю. Одумом (см. обзор Одум, 1975), об энергии как главном лимитирующем факторе в пищевых цепях (сетях) и совпадении потоков энергии и вещества в пищевой сети. Трех-четырех звенная схема, в которой первое звено представляет некий "черный ящик", включающий и растительный опад, и микроорганизмы на нем развивающиеся, и даже простейших, потребляющих эти микроорганизмы; второе звено - детритофагов, поглощающих в той или иной степени все эти источники пищи, а третье и последующие звенья - хищников соответствующего порядка, при всех модификациях осталась по сути неизменной со времени ее опубликования Одумами (цит. по Одум, 1975). Отнесение потребителей микроорганизмов ко второму гетеротрофному трофическому уровню (Heal, Maclean, 1975; Стриганова, 1980), на котором находятся хищники I порядка, не меняет существа дела, так как микроорганизмы в этих схемах не выделены в отдельное звено или трофический уровень, хотя Одум (Wiegert et al, 1970) указывал на то, что детритофаги используют в качестве источника энергии микроорганизмы.

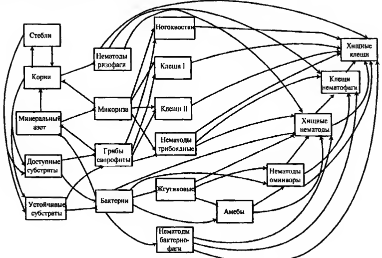


Рис. 1. Концептуальная схема детритной пищевой сети на основе энергетического подхода. Клещи I и II – это разделение быстро растущих и медленно растущих грибоядных клещей (по Coleman, Crossley, 1996).

В более поздних концептуальных моделях детритной пищевой сети (Ingham et al., 1986; Hunt et al., 1987) микроорганизмы указаны как звено, предшествующее бактериофагам или микофагам, но растительноядные нематоды отнесены к тому же трофическому уровню, что и грибы и бактерии. Эта схема (рис. 1) с небольшими изменениями продолжает существовать и в новых моделях (De Ruiter et al., 1994; Coleman, Crossley, 1996).

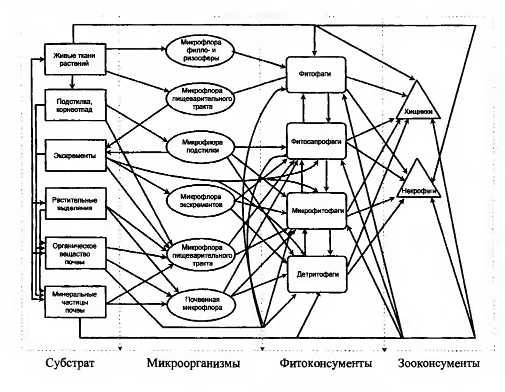


Рис. 2. Концептуальная схема пищевой цепи в экосистеме (по: Криволуцкий, Покаржевский, 1988, с изменениями)

Другая концептуальная схема была предложена, исходя из физиологии питания животных и баланса незаменимых аминокислот и фосфора в популяциях растительноядных и сапротрофных почвенных животных (Криволуцкий, Покаржевский, 1988). В ней выделено (рис. 2), в отличие от предыдущей схемы,

облигатное микробное звено, предшествующее звену растительноядных или сапротрофных животных и соответственно, три гетеротрофных уровня: мнкроорганнзмы - растительносубстратные животные (фнтоконсументы) - животносубстратные жнвотные (зооконсументы).

Необходимость выделения микробного звена в пнщевой сетн сводилась к следующему (Крнволуцкнй, Покаржевский, 1988):

1. Тнп питания, определенный по поглощаемой пнще, не соответствует характеру процессов пищеварения. Потребности в незаменимых амннокислотах, которымн бедны растительные тканн, особенно мертвые, ставят животных в зависимость от нсточннков микробного или животного белка. При этом, крупные растительноядные жнвотные, в том чнсле н почвенные (включая потребителей мертвых растительных остатков), в своем питании (белковом и энергетическом) тесно связаны с микроорганизмами пищеварнтельного тракта. Такие взаимоотношения жнвотных н микроорганнзмов пнщеварительного тракта, определены как *внутренние цепи питания* (Наумова, 1981).

2. Кроме внутренних цепей питания использованне грибного нлн бактериального белка хорошо известно не только для представителей мнкрофауны нли микроартропод. Так называемые ксилофильные насекомые, еслн они не используют микроорганнзмы пищеварительного тракта, то питаются грнбами, развнвающимися в проделанных в древеснне ходах и на копролитах насекомых. В определенные периоды роста и развнтия многие внды растительноядных жнвотных нспытывают резкий недостаток в белковой пище, а также в витаминах, которыми их не могут снабдить микроорганизмы как симбиотическне, так н несимбнотические. То же самое пронсходит и при переуплотнениях популяций животных. Поэтому каннибалнзм, животнояденне н некрофагию следует считать обычным явленнем в популяциях животных, страдающих недостатком белковой пищн.

3. Животные получают энергию (энергоносителн) н элементы разными путями. Аминокислоты и белки как основные конструкционные материалы организма животных, не являются основными энергоносителямн, функцию которых несут сахара и липиды. Энергоносители поступают в организм

непосредственно нз поглощениой пищи, а азот и фосфор через свободиоживущне микроорганизмы или микрооргаиизмы пищеварительиого тракта.

4. Получение энергоносителей организмом животных-фитосапрофагов и, частичио, фитофагов и потребнтелей микроорганизмов, осуществляется за счет деятельности целлюлозоразрушающих мнкроорганизмов пищеварнтельиого тракта, которые разрушают клетчатку до простых сахаров.

Развитне модели прнвело к тому, что трофический уровень микроорганизмов рассматривается как уровень продуцеитов белка или провайдеров пищевой сети иезаменимыми веществами (Покаржевский н др., 2000; Pokarzhevskii et al., 2003). Кроме того, эта схема позволила объяснить структуру сборного начального звена - "черного ящика" в схеме Одумов, поскольку была сопоставлена с представленнем об нерархической структуре экосистем почвы (рис. 3), вытекающей из аиализа бионидикациоииых исследоваиий (Pokarzhevskii, 1996; Покаржевский и др., 2000).

Эта структура состоит, по крайиеи мере, нз трех относнтельно незавнснмых н биогеохимически закрытых пространственно-временных экосистем. Первая - это бактериально-водорослево-протозойиая илн экоснстема одноклеточных органнзмов, хотя в ней представлеиы и самые мелкие миогоклеточные оргаиизмы, такие как коловратки, нематоды, тихоходки. Эти экосистемы объемом от нескольких кубических миллиметров до нескольких кубических сантиметров изолированы в пленках воды почвенных пустот или на поверхности корией илн подстилки. Экологическое время (время одной стадии сукцесснн) в таких экоснстемах варьирует от нескольких дней до месяца и время полного бнологического круговорота (время, за которое поток пнтательных веществ, проходящий через экосистему, стаиовится равным их массе в биомассе экосистемы) колеблется от дня до иедели.

Вторая экосистема более высокого иерархического уровня, в которую пространственно входят и первые экоснстемы - это фунгиально-микроартроподная экоснстема или экоснстема мелких многоклеточных органнзмов, в которой обитают и ювеиильные особн крупных почвеиных животных. Эти экоснстемы изолированы в почвенных порах и пустотах внутри подстилки. Обычио они ограничены объемом рнзосферы отдельных растений или

талломом лишайников. Экологическое время в них меняется от недели до нескольких месяцев, а время полного биологического круговорота от дней до месяца.

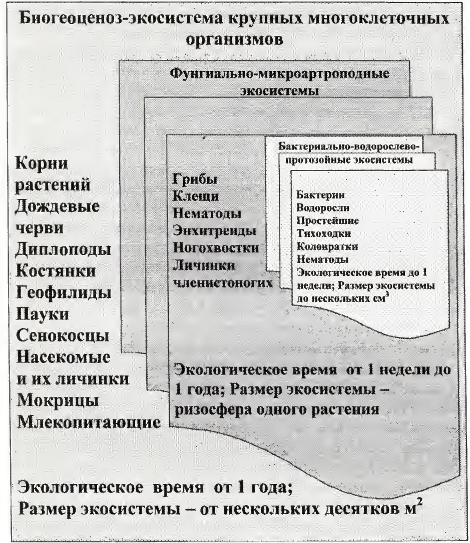


Рис. 3. Иерархическая система почвенных экосистем (Pokarzhevskii, 1996)

Третья экосистема – это биогеоценоз или экосистема крупных многоклеточных организмов. Она ограничена границамн бногеоценоза и экологическое время в ней варьирует от года до десятков лет и время полного биологического круговорота от нескольких месяцев до нескольких лет. Внутрн каждой из этих экоснстем специфика отдельного вида может быть сходной, но с точки зрения бногеоценоза (человека) по мере уменьшения размеров вида происходит нивелировка специфики вида в экоснстемных процессах н в реакции его популяций на действне разных факторов.

Такая нерархическая структура объясняет в первую очередь высокое бноразнообразне почвенных обнтателей, которые живут не только в отдельных относительно мало связанных между собой экоснстемах разного размерного и временного уровня, о чем как об отдельных местообитаннях говорил М.С. Гиляров (1965), но и образуют в каждой такой экосистеме свон собственные пищевые сети.

Каждая из размерных групп животных нспользует свон нсточники пищи. В бактериально-водорослево-протозойной экоснстеме - это бактерии н водоросли или животных сходного размера, в фунгиально-микроартроподной экосистеме - это грибы или животных сходного размера, и в биогеоценозе - это растительные ткани или жнвотных сходного размера. К этому подошлн еще Хил и Дайтон (Heal, Dighton, 1985), когда разделилн размерные группы почвенных жнвотных на микрофагов, мезофагов и макрофагов.

При этом в процессе развития животные могут из меньшей размерной группы переходить в большую (соответственно в экосистему другого размерного уровня) и прн этом нзменять характер питания. Большне почвенные н наземные животные могут использовать в качестве нсточнннка питательных веществ целиком экосистемы другого размерного уровня. Более того, эти экоснстемы могут развиваться в их пищеварительном тракте и доступ минеральных и органических веществ в них будет определяться питанием организма-хозяина, хотя в целом они имеют внутренние относительно замкнутые циклы вещества. Таким образом крупные животные - детритофаги, фитосапрофаги н фитофаги, по сути дела, являются потребителями экосистем - экоснстемофагами (Pokarzhevskii et al., 1997). Эти экосистемы являются аналогами микробного звена

(бактериального или грибного) в экосистемах соответствующего размерного уровня. В фунгиально-микроартроподных экосистемах ряд организмов является потребителями бактериально-водорослево-протозойных экосистем или их обитателей. К ним относятся и грибы, которые способны или к бактериолизису и использованию фиксируемого бактериями азота или к потреблению витаминов или ростовых веществ, продуцируемых бактериями, и хищничеству (потреблению простейших, нематод), так называемые клещи-бактериофаги, коллемболы, поглощающие водоросли, энхитреиды, поглощающие с органическим веществом не только грибы, но и бактерий. Орибатиды, гамазовые клещи, коллемболы питаются простейшими, тихоходками, нематодами.

Таким образом, мы наблюдаем последовательную экосистемофагию в экосистемах более высокого размерного уровня. Поэтому в наиболее общем виде детритную пищевую сеть можно представить в виде схемы (рис. 4), в которой отражены эти взаимоотношения.

Похожие взгляды в последнее время развиваются и другими специалистами в области питания беспозвоночных или исследования круговорота (Барнс и др., 1992; Wardle, 1995). Вместе с тем они не выделяют экосистемофагию как тип питания и не принимают в расчет микрофлору и экосистемы пищеварительного тракта как отдельное звено пищевой сети и не рассматривают экосистемы различного размерного уровня, что существенно для понимания связи биоразнообразия с функционированием детритной пищевой сети.

Очевидно, что разнообразие на одном размерном уровне не обязательно должно сказываться на разнообразии и функционировании пищевой сети на другом размерном уровне, так как скорее важны ресурсы тех или иных незаменимых элементов и соединений в экосистемах предшествующего уровня, чем собственно разнообразие. Тем не менее, биоразнообразие внутри экосистемы определенного уровня должно влиять на функционирование детритной пищевой сети в целом, так как реализуется через разнообразие функциональных показателей биологической активности почв. Это в свою очередь влияет на ресурсы доступных веществ в почве и в экосистемах разных уровней. Поэтому изучение связи разнообразия и функционирования детритных пищевых сетей должно быть структурировано, в соответствии с представлениями об экосистемах

разного размерного уровня и включать исследование функциональных характеристик биоты и ресурсов важнейших элементов и соединений.

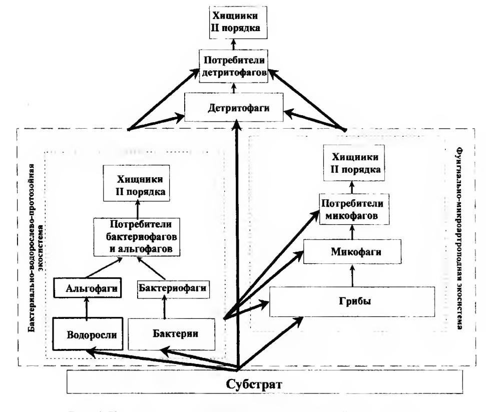


Рис. 4. Концептуальная схема детритной пищевой сети в почве.

В соответствии с этим и было составлено данное методическое руководство, включающее необходимые и проверенные методы оценки структуры, функционирования и разнообразие детритных пищевых сетей.

<u>ПРОТОКОЛЫ МЕТОДОВ</u>

ПЛАНИРОВАНИЕ РАБОТЫ И ОТБОР ПРОБ

Корректные оценки структуры, биоразнообразия и функционирования детритной пищевой сети в экологических и биогеографических работах во многом зависят от правильного планирования исследования и отбора проб.

Для достижения поставленной цели предлагается следующая схема действий, условно разделенная на пять этапов:

1. сбор и гармонизация данных (этому этапу посвящена большая часть руководства); последующие этапы обсуждаются в последнем разделе руководства
2. интеграция данных в пространственную базу;
3. оценка степени изученности территории;
4. картографирование разнообразия;
5. анализ полученных результатов.

Выбор пробных площадок зависит от задач исследования, но в большинстве случаев это или пробные площади на исследовательском профиле или пробные площади в определенном типе ландшафта.

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПРОФИЛЯ

<u>Необходимое оборудование и материалы.</u>

1. Прибор определения географических координат (GPS). Существует много модификаций подобных приборов. Одним из наиболее удобных, но непрофессиональных, является прибор Garmin eTrex Summit, включающий как собственно определитель географических координат, так и компас и альтиметр. Альтиметр приходится достаточно часто калибровать по барометру. Поэтому также требуется небольшой барометр.
2. Картографическая основа или картосхема местности для нанесения точек.
3. Мерные ленты – 50 м и 5 м
4. Эркер
5. Мерная рейка 2 м
6. Рейки для разметки профиля

7. Цветная изоляционная лента для меток на рейках, деревьях
8. Маркер водоустойчивый черный
9. Полевой дневник
10. Авторучки, карандаши
11. Киянка для забивания реек
12. Топор
13. Небольшая лопатка.

Необходимое число работников: минимум 3 человека. Один делает необходимые записи, два других прокладывают профиль.

Процедура.

1. На карте или схеме профиль ориентируется и устанавливается его примерная длина. Профиль лучше прокладывать через малый водосбор, малый водораздел или на катене. Длина профиля не должна превышать 1500 м, так как его разбивка займет полный рабочий день, также как и отбор проб при сплошном учете. Наиболее приемлемая ширина профиля 50 м. Она позволяет охватить наиболее характерные ассоциации внутри ландшафта. Большая ширина профиля неудобна внутри лесных экосистем, так как не позволяет сделать точную ориентировку на местности. Меньшая ширина профиля ведет к снижению разнообразия местообитаний внутри профиля и, следовательно, к увеличению ошибок связанных с гетерогенностью почвенного покрова.
2. Первую точку лучше всего выбрать у заметного знака (дерева, на холмике или в хорошо выраженном понижении). Это не позволит блуждать в поиске профиля в следующий раз. Сразу же в точке определяется направление профиля и устанавливается эркер для определения параллельной стороны профиля.
3. В первой точке проводится замер географических координат точки и ее краткое геоботаническое описание. Затем по эркеру и с помощью мерной ленты определяется начальная точка на параллельной стороне профиля, которой присваивается второй номер. Для нее делается замер координат и краткое описание. И первая и вторая точки отмечаются рейками с номерами и цветной меткой для последующего обнаружения. Учитывая стиль поведения наших сограждан, рейка не должна быть слишком заметной и высокой. Ради забавы такую рейку обязательно сломают. И сделать это могут не деревенские ребята, а,

что ни иа есть, "новые русские". По этим же причинам не стоит на рейках указывать координаты точки или набивать фаиерку с координатами. Почему-то такие рейки становятся в первую очередь жертвами вандалов.

4. Далее профиль закладывается от первой точки в выбраиом направлении. Реперные точки, определяющие направление профиля, стоит закладывать через 50 м, тогда они реже попадаются иа глаза грибников, охотников и праздной публики. Координаты каждой точки заносятся в диевиик, и делается ее краткое геоботаническое описание. Номер каждой точки иечетный, для того чтобы не путать стороны профиля. При иаличии четвертого работника возможно параллельное маркирование четной стороны профиля и описание точек. Маркировочиые рейки не стоит устанавливать в агроцеиозах, так как там они исчезают с началом проведения сельскохозяйственных работ.

5. Разбивка профиля заканчивается нанесением точек иа картографическую осиову или схему профиля и заносится в базу даиных (электронную таблицу).

6. Закладка пробиых площадей проводится при иаличии контрастных экосистем на заметном (более 1500 м) удалеиии друг от друга или внутри определенного типа ландшафта на плакоре. Оптимальный размер пробной площади, внутри которой будет вестись исследование, обычно равен 50 х 50 или 100 х 100 м. Пробиая площадь размером 1 га является стаидартом. Площадка размером 50 х 50 м также вполие приемлема для исследоваиий детритиой пищевой сети при использовании щадящих почву методов учета и определенных путях передвижения по площадке.

7. Первую точку иа площадке лучше установить у заметного знака, хотя это и необязательно, так как площадку лучше ориентировать от первой точки иа север ко второй и иа восток к четвертой. Затем делается замер географических координат первой точки

8. По эркеру и с помощью мериой ленты определяется вторая точка с замером географических координат. От второй точки с помощью эркера и мерной ленты определяется третья точка с замером географических координат. Затем от третьей точки определяется положение четвертой точки с замером географических координат. Равеиство сторои квадрата определяется иахождением первой точки от четвертой с помощью эркера и мериой ленты. Нумерация точек ведется по

часовой стрелке. Каждая угловая точка отмечается рейкой с цветовой меткой изоляционной лентой и номером.

9. После закладки площадки делается ее ботаническое описание. Лучше всего если сама площадка будет разбита на квадраты 5 х 5 м и каждая угловая точка будет кратко описана.

10. Результаты описания заносятся в базу данных и используются для построения схемы площадки.

11. При проведении полномасштабного исследования площадки внутри профиля описываются подобным способом. Отличия только в нумерации угловых точек (из-за наличия нечетной и четной сторон) и в направлении, так как профиль может быть не ориентирован строго на какую-либо сторону света.

Отбор проб для учёта структуры, разнообразия и функционирования детритной пищевой сети

Необходимое оборудование и материалы.

1. Пробники размером 10 х 10 х 10 см и 10 х 10 х 30 см или бур диаметром 9 или 10 см и высотой 30 см
2. Складной метр
3. Мерная лента 50 и 5 м.
4. Небольшая лопата
5. Нож кухонный
6. Совок садовый на длинной ручке
7. Мешки полиэтиленовые плотные «шуршащие» размером не менее 25 х 40 см, лучше 30 х 40 см или пластиковые контейнеры объемом 500-600 мл с крышкой
8. Мешки для мусора плотные объемом 60 л
9. Карандаши
10. Бумага для этикеток
11. Дневник авторучка
12. Резинки для денег
13. Скотч
14. Рюкзаки для переноса проб
15. Сумки холодильники (для жаркой погоды) и холодильные элементы

16. Маркер водоустойчивый

Процедура.

Пробы для учета численности, биомассы и доминантных видов или групп крупных почвенных животных.

1. Внутри пробной площади разбивается площадка размером 20 х 20 м.
2. Размечается сетка с шагом 5 м.
3. По сетке отбирается 25 проб или буром или пробником.
4. Каждая проба при необходимости делится на слои толщиной 5 или 10 см в зависимости от задач исследования. Каждый слой, если проба целиком, то вся проба помещаются в пластиковый пакет, в который опускается этикетка. Необходимо помнить, что срок жизни бумажной этикетки не более 1 месяца. В случае отбора только верхнего 5-10 см слоя более удобны пластиковые контейнеры объемом 500-600 мл с пластиковыми крышками, на внешней стороне которых пишут параллельную этикетку водоустойчивым маркером.
5. Пакет или завязывают или заматывают резиновыми кольцами. Пакеты помещают в мешки для мусора емкостью 60 л, а затем или в рюкзаки или в сумки-холодильники для доставки в лабораторию. Контейнеры заклеивают скотчем.
6. В случае хранения пакеты помещают в холодильник или помещение с температурой $5^{O}C$ до 1 недели.
7. В случае исследования пространственного распределения на уровне исследуемой точки пробы берут лентой плотно одна к другой. Ширина ленты колеблется от 5 х 20 до 6 х 24 пробы в ленте. Всего 100-144 пробы. Последовательность операций пп.3-6.
8. В случае исследования пространственного распределения на уровне фитоценоза пробы берутся по сетке с шагом 5 м внутри пробной площади 45 х 45 м или 50 х 50 м. Внутри площадки дополнительно берутся пробы сплошной лентой 5 х 5 проб. Всего 125-136 проб. Последовательность операций пп.3-6.
9. В случае исследования пространственного распределения на профиле пробы берутся по сетке с шагом 10 м. Ширина профиля 50 м (6 проб). Длина в зависимости от длины профиля. Максимальное число проб 950. Именно такое число проб возможно разобрать в течение недели при полном рабочем дне

бригадой из 4 человек. Пробы можно отбирать при стабильной погоде в течение 2 суток. Последовательность операций пп.3-6.

10. Все пробы доставляются в лабораторию для дальнейшей разборки.

Отбор проб и их число зависит от задач исследования. Изучение пространственного распределения крупных почвенных животных на уровне исследуемой точки показало (табл. 1), что в разных природных зонах необходимое число проб может колебаться. Однако в большинстве случаев достаточное число проб для учета численности крупных почвенных обитателей 25 в учет.

Таблица 1. Минимальные объёмы выборки при почвенно-экологических исследованиях (Савин, неопубликованные данные).

Способ оценки			Оторфованная почва	Дерново-подзолистая почва	Бурая лесная почва
способ расположение проб	систематический	средняя численность	30-35	20-25	25-30
		стандартиая ошибка	30-35	35-40	20-25
		доверительный интервал	25-30	5-10	5-10
	случайный	средняя численность	30-35	30-35	20-25
		стандартиая ошибка	20-25	25-30	20-25
		доверительный интервал	30-35	10-15	20-25

Число необходимых проб для учета 50% видов и групп (учета доминантов), по данным того же исследования колеблется в пределах 15-20 проб, тогда как для полного учета всех групп необходимо порядка 80-100 проб.

Иногда один и тот же образец подразделяют на субобразцы для экстракции разных размерных групп животных или экстрагируемых разными методами (Persson, 1980). Сравнительная трудоемкость отбора проб показана в табл. 2.

Вместе с тем, при поиске связи между физико-химическими и иными показателями почв, иногда требуются и пробы большего размера, так как такие связи проявляются в зависимости от размеров животных (величины их

индивидуальных участков). В таких случаях размер проб следует увеличить до 20 x 20 или 25 x 25 см. Число же проб следует оставить в пределах 25, выбирая только представителей одной группы почвенных обитателей. Пробы также отбирают в полиэтиленовые мешки и разбирают в лаборатории. Пробы 50 x 50 см ныне используют в редких случаях, например, для учета редких групп животиых. При этом необходимо слой почвы сразу перемещать в мешок объемом 60 л и разбирать пробы после выемки всех слоев. В ином случае животные, как показали наши исследования в черноземах, уходят вглубь и в стороны из неотобранных слоев из-за высыхания и нарушений, связанных с отбором верхних слоев.

Пробы почвы после ручной выборки животных можио использовать для определения физико-химических показателей почвы.

Таблица 2. Количество особей различных групп на пробу и соотиошеиие затрат на разборку проб различного размера, используемых при почвенно-зоологических раскопках (Покаржевский, Филимоиова иеопубликоваиные данные).

Проба	10 x 10 x 10 см		25 x 25 x 10 см		50 x 50 x 10 см	
Биотоп	лес	степь	лес	степь	лес	степь
Черви	0-3	0-6	0-7	0-11	5-30	5-25
Пауки	0-3	0-2	0-4	0-4	1-6	1-6
Кивсяки	0-2	0-2	0-5	0-6	4-40	4-30
Костянки	0-10	0-3	3-15	0-4	8-30	1-8
Геофилиды	0-5	0-4	0-8	0-7	2-30	2-15
Мокрицы	0-4	0-1	0-8	0-3	2-12	0-6
Стафилины	0-2	0-8	0-9	0-7	1-12	1-12
Жужелицы	0-2	0-1	0-4	0-3	0-6	0-6
Проволочники	0-2	0-4	0-5	0-5	0-8	1-10
Двукрылые	0-8	0-3	0-24	0-6	3-47	3-15
Моллюски	0-1	0-1	0-3	0-2	0-8	0-5
Площадь, нарушаемая при отборе пробы	400 см^2		0,5 м^2		2,5 м^2	
Место разбора	лаборатория		лаборатория		на месте	
Время на пробу	3-10 мин		20-60 мии		1-3 часа	
Число разборщиков	1-3		2-4		4-5	
Число проб в день	60-120		5-20		4-8	
Необходимое число проб для оценки численности до глубины 30 см	30-60		24-48		9-15	

Определение фракциоиного состава почвы

Почва размывается водой, и после просеивания песчаной фракции распределение частиц разного размера определяется осаждением и выражается в процентах.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Пластиковые стаканы объемом 600 мл
2. Электрическая качалка
3. Сито с размером ячеи 0, 063 мм (16 номер)
4. Пипетки
5. Воронки
6. Литровые градуированные цилиндры с пробкой (внутренний диаметр 6 см и высота 45 см)
7. Чашки для выпаривания
8. 0,1 М раствор пирофосфата натрия (44,408 г $Na_4P_2O_7*10H_2O$ растворить в дистиллированной воде и довести раствор до 1 л в мерной колбе)
9. 15% раствор перекиси водорода в дистиллированной воде
10. Дистиллированная вода

Процедура.

1. Предварительно определить отношение абсолютно сухой массы и воздушно-сухой массы почвы, высушив почву до постоянного веса при температуре $105^{O}C$ в течение 6 ч, а затем взвесив ее.
2. Взвесить 10 г воздушно-сухой почвы (предварительно просеянной через сито 2 мм) в стакане и залить 25 мл раствора пирофосфата натрия.
3. Оставить на ночь (12 ч)
4. Добавить 200 мл дистиллированной воды и взбалтывать в течение 6 часов на качалке
5. Перенести смесь на поверхность сита, опущенного в воронку, и промывать дистиллированной водой (максимум 700 мл) до полного промыва частиц меньшего размера в цилиндр.
6. Промывные воды перенести в литровый цилиндр и довести объем до 1 л

7. Смыть с сита песчаную фракцию в предварительио взвешенную выпарительную чашку и высушить ее до постояниого веса при температуре 105^{o}C. После высушивания чашку охладить в эксикаторе в течение 2 ч и взвесить.

8. Промывные воды хорошенько перемешать в течение 1 мин для получения гомогенной суспеизии.

9. Поставить цилиндр при комнатной температуре на место без вибрации.

10. Через определенный период (в соответствии с табл. 4) быстро удалить 20 мл суспензии при помощи пипетки с глубины 10 см от поверхности воды.

11. Перенести суспензию в предварительно взвешенную выпарительную чашку и высушить до постоянного веса при температуре 105^{o}C. Чашку охладить и взвесить. Соответственно, масса первой порции будет составлять массу тонкого и среднего ила, а масса второй порции - глинистых частиц.

12. Для определеиия массы пирофосфата натрия, которую следует вычесть из полученных величин масс, иеобходимо растворить 25 мл раствора пирофосфата в литре дистиллированной воды и отобрать 20 мл получеииого раствора пипеткой. Переиести раствор в предварительио взвешеиную выпарительную чашку и высушить до постояниого веса при температуре 105^{o}C. Чашку охладить и взвесить.

Расчет полученных результатов

Таблица 3. Параметры, необходимые для расчета седиментации на широте Москвы

Глубина погружения пипетки	10 см
Реальная плотность	2,65 г/см^3
Плотность диспергирующей жидкости (воды при 20^{o}C)	1г/см^3
Гравитация на широте Москвы на уровне океана	981,56 см/сек^2
Вязкость диспергирующей жидкости	0,01 г/сек

Таблица 4. Время отбора отдельных фракций пипеткой для взвешивания

Комнатная температура	Время отбора пробы на тонкий и средний ил	Время отбора пробы на глинистые частицы
18^{o}C	4 мин 52 сек	8 ч 08 мин
19^{o}C	4 мин 45 сек	7 ч 56 мин
20^{o}C	4 мин 37 сек	7 ч 42 мин
21^{o}C	4 мин 31 сек	7 ч 33 мин
22^{o}C	4 мин 25 сек	7 ч 22 мин

Доля песчаной фракцнн (>0,063 мм)

$$\frac{(W_1 * 100) * f}{10} = \% \cdot песка \ (S)$$

Доля тонкого н среднего ила (0,002-0,02 мм)

$$\frac{(W_2 - SP) * 100 * f}{0,2} = \% \cdot тонкого \ \cdot (FU) \cdot и \cdot среднего \ \cdot ила \cdot (mU)$$

Доля глинистых частиц (<0,002 мм)

$$\frac{(W_3 - SP) * 100 * f}{0,2} = \% \cdot глинистых \ \cdot частиц \ \cdot (C)$$

Доля грубого ила (0,02-0,063 мм)

$$[100 - (\%S + \%FU \& mU + \%C)] * f = \% \cdot грубого \cdot ила \cdot (gU)$$

где W_1 – масса песка, W_2 – масса первой порцин, отобранной пнпеткой, W_3 – масса второй порции, отобранной пнпеткой, SP – масса пирофосфата натрня отобранного пипеткой, f – поправка на содержание воды в почве (абсолютно сухой вес, деленный на воздушно-сухой вес), 10 - начальная масса почвы (в граммах), 0,2 – аликвота почвенной массы в 20 мл суспензии.

Почвы с долей органического вещества менее 5% не обрабатываются перекисью водорода. Почвы с содержаннем органического вещества 5-15% предварительно обрабатываются разбавленной (15%) перекисью водорода.

Процедура.

1. Увлажнить почву н тщательно перемешать с разбавленной перекнсью водорода
2. Перемешивать постоянно, нагревая на водяной бане
3. Добавлять небольшие порции перекисн до тех пор, пока образец не будет лншь слегка дымиться.
4. Избыток перекисн удалить выпариваннем
5. Далее как для почв, небогатых органическим веществом

Размер частиц может быть определен пипеточным методом при температуре $20^{O}C$ и погружении пипетки на 10 см по следующей временной схеме:

>0,063 мм после 29 сек (грубый нл)

<0,010 после 18 мин 31 сек

<0,006 после 51 мин 23 сек (тонкнй ил)

Для оценки только песка, ила и глины можно определить песок и глину, а ил получить вычитанием этих фракций из массы почвы.

Этого может быть достаточно для оценки пространственного распределения почвенных животных, но не для общей оценки условий обитания животных на определенном участке или в определенном местообитании.

Для оценки почвенной текстуры можно использовать таблицу 5.

Таблица 5. Классификация почв по механическому составу (по Schinner et al., 1996)

Почвенная градация	Почвенная текстура		Содержание %		
			Глина <2 μм	Ил 2-60 μм	Песок 60-2000 μм
Очень легкая	Песок	S	0-10	0-30	70-100
	Связанный песок	uS	0-5	30-55	40-70
Легкая	Супесь	lS	5-15	10-55	30-80
	Пылеватая супесь	sU	0-15	5-75	25-45
	Пыль	U	0-25	75-100	0-25
Средне-тяжелая	Глинистый песок	cS	10-25	0-10	65-90
	Песчанистый тяжелый суглинок	sL	15-25	10-55	20-75
	Суглинок	lU	15-25	55-75	0-30
Тяжелая	Песчанистая глина	sC	25-40	0-10	50-75
	Тяжелый суглинок	L	25-40	10-55	5-65
	Пылеватый тяжелый суглинок	uL	25-45	55-75	0-20
Очень тяжелая	Пылеватая глина	lC	40-50	0-55	0-60
	Глина	C	>50	0-50	0-50

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАЗОВЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОЧВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

Необходимое оборудование и материалы.

1. Сита почвенные 5, 3, 2, 0,5 и 0,25 мм
2. Весы технические электронные с точностью определения 50-100 мг.
3. Весы лабораторные электронные с точностью определения до 10 мг
4. Воронки пластиковые
5. Пластиковая пленка для упаковки продуктов
6. Стаканы пластиковые объемом 100 и 500 мл

7. Колбы конические 100 мл
8. Стеклянные стаканы 250 и 500 мл.
9. Фарфоровые тигли
10.Песок силикатный
11.0,01 М раствор хлористого кальция (1,47 г $CaCl_2*2H_2O$ растворяют в 1 л дистиллированной воды при температуре 20^0C) или 1М раствор KCl (74,5 г растворяют в 1 л дистиллированной воды при температуре 20^0C)
12.Водопроводная вода
13.Дистиллированная вода
14.Раствор 0,1 н HCl
15.Раствор 0,1 н NaOH
16.Муфельная печь с поддержанием температуры в пределах 10^0C
17.Лабораторный pH-метр с точностью определения 0,01 единицы pH
18.Лабораторный кондуктометр или электроды для кондуктометрии к pH-метру.
19.Кофемолка для размола проб.

Предварительная обработка проб

1. Пробу предварительно высушивают до воздушно-сухого веса.
2. Сухую пробу просеивают через почвенные сита, удаляя корешки, неразложившуюся часть подстилки, камни, гравий.
3. В случае отбора органической части почвы на песке фракцию чистого песка менее 0,25 мм отбрасывают.
4. Фракция менее 2 мм рассматривается как почва.
5. Фракцию более 2 мм разделяют на мелкий гравий и органическую ферментативную часть подстилки.
6. Крупные комки почвы измельчают в кофемолке и просеивают через сито с ячеей 2 мм. После просеивания фракции в соответствии с размером объединяют.
7. Отдельные фракции взвешивают с точностью до 0,1 г.
8. После этого из подготовленных проб отбирают навески для определения потерь от прокаливания, максимальной водоудерживающей способности, pH почвы, органического углерода и азота, фосфора, катионообменной способности по Каппену-Гильковицу, содержания глинистых частиц.

Определенне потерь от прокалнвання

1. Перед определением иа электрических весах с точностью измереиия 0,01г измеряют массу предварительно прокалеииого при температуре 450°C фарфорового тигля.
2. Образец почвы, приблизительио 5-15 г, в зависимости от объема тигля, помещают в тигель и высушивают в сушильиом шкафу при температуре 105°C в течение 6 часов
3. После высушивания определяют вес тигля с высушенным образцом почвы.
4. Образец почвы прокаливают в муфельиой печи при температуре 250°C течение 1 часа. После обугливания образца его выдержнвают при 450°C в течеиие 5 часов.
5. После прокаливания тигель с образцом переиосят в эксикатор с безводным хлоридом калня и охлаждают до комиатной температуры.
6. После охлаждения массу прокалениого образца с тиглем нзмеряют с точиостью до 0,01 г.

Потери от прокаливания в пробе почвы (% t) рассчитывают по формуле и выражают в % сухой массы:

$$t\% = \frac{(m_2 - m_1) - (m_3 - m_1)}{m_3 - m_1} * 100\ \%$$

Определение максимальной влагоудержнвающей способности почвы

1. Собирают установку, состоящую нз следующих компонеитов: пластиковый стакан - пластиковая воронка - фильтр (черная лента=диаметр пор 0,03 нм).
2. В пластиковый стакан насыпают песок, чтобы иосик воронкн был в него погружеи, и песок смачивают водой до иасыщеиия.
3. В воронку на фильтр помещают навеску почвы приблизительно 10-20 г. На 10 проб делают один холостой опыт (без почвы).
4. В воронки приливают сиачала 100 мл и затем после смачивания почвы (через 10-15 мин) еще 50 мл воды.
5. После приливания последией дозы воды воронки закрывают пищевой полиэтиленовой пленкой и оставляют пробы ие менее чем на 6 ч (на ночь).

6. Утром фильтры с образцамн н холостые фильтры перекладывают в предварительно взвешенные чашки Петри.
7. Чашки Петри с содержнмым взвешивают с точностью до 0,01 г н помещают в сушильный шкаф при температуре 105°C.
8. Пробы высушивают до постоянного веса в течение 6 часов.
9. После высушивания чашки Петрн с образцамн переносят в эксикатор с безводным хлоридом калия и охлаждают в теченне 1 часа чашки Петри.
10. После охлаждения образцы взвешивают с точностью до 0,01 г.
11. Максимальную водоудержнвающую способность почвы (WHC, %) рассчитывают по формуле:

$$WHC\% = \frac{(m_2 - m_3) - (m_4 - m_5)}{m_4 - m_5} * 100\%$$

Определенне pH почвы[1]

Процедура.

1. Пробу почвы массой 5г (в пересчете на сухой вес) перед определеннем отвешивают в пластиковый стаканчик объемом 100 мл на электронных весах с точностью до 0,01г.
2. Взвешенный образец заливают 12,5 мл 0,01М раствора $CaCl_2$ нли 1М раствора KCl и покрывают пластиковой пищевой пленкой
3. Полученную суспензню взбалтывают в течение 5 минут, нспользуя электрическую качалку прн минимальном числе оборотов (20-40 в мнн).
4. Суспензию оставляют на 2 часа для установления равновесия между раствором и почвой.
1. После этого определяют pH раствора над почвой с точностью до 0,01 pH.

Определенне электропроводности почвы и pH водной вытяжки

1. Отвешивают 10 г почвы в пластиковый стаканчик
2. Заливают пробу 35 мл дистиллированной воды и встряхивают при минимальных оборотах на электрнческой качалке в теченне 2 часов.
3. Суспензию оставляют в течение 24 часов при комнатной температуре.

[1] по методике Международной организации стандартов ISO-10390:1994(E)

4. Определяют электропроводность почвы с помощью электрокондуктометра
5. После определения электропроводности определяют pH водной вытяжки.

Определение суммы обменных оснований по Каппену – Гильковицу

Метод основан на вытеснении обменных оснований 0,1 нормальным раствором соляной кислоты и приблизительной оценке суммы обменных оснований на основе разности между содержанием ионов водорода в растворе.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Конические колбы 50 и 100 мл
2. Пипетки мерные 25 и 50 мл
3. Фильтры бумажные
4. Алюминиевая фольга или Парафильм
5. Бюретка с автоматической установкой нуля
6. Стеклянные воронки
7. Весы электрические с точностью взвешивания до 0,01 г
8. Электрическая качалка
9. 0,1 н раствор HCl
10. 0,1 н раствор NaOH
11. 1% спиртовой раствор фенолфталеина

Процедура.

1. Взвесить 10 г просеянной почвы (5 г черноземной почвы) в конической колбе 100 мл
2. Установить точный титр 0,1 н раствора HCl, оттировав его 0,1 н раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления устойчивой слабо-розовой окраски не исчезающей в течение 1 мин
3. Внести 50 мл 0,1 н раствора HCl в колбу
4. Установить колбу на электрическую качалку и взбалтывать в течение часа при минимальном числе оборотов
6. Колбу оставить на 24 часа, прикрыв отверстие колбы алюминиевой фольгой, Парафильмом или пищевой пленкой.
7. Профильтровать все содержимое колбы через фильтр, отбрасывая первые мутные порции фильтрата
8. Подождать полчаса оседания мути.

9. Отобрать пипеткой 25 мл фильтрата и перенести в колбу на 50 мл.
10. Добавить фенолфталеин.
11. Титровать содержимое колбы 0,1 н раствором NaOH до появления устойчивой слабо-розовой окраски не исчезающей в течение 1 мин

Расчет. Сумму обменных оснований рассчитывают в мг-экв на 100 г почвы, исходя из объема вытесненных кислотой оснований. Эта величина определяется как частное от деления разности между эквивалентами исходного и конечного содержания соляной кислоты в растворе, установленным на основе титрования на массу навески почвы по формуле:

$$\frac{(25мл * nHCl) - (Xмл * nNaOH)}{Yг} * 200$$

где n – нормальность раствора, X – количество мл раствора щелочи пошедшего на титрование, Y – масса навески почвы (в граммах), 200 – коэффициент пересчета в мг-экв на 100 г почвы, так как 25 мл это половина исходного объема титруемого раствора.

Замечание. Оценка суммы обменных оснований по Каппену – Гильковицу приблизительная, так как не все основания вытесняются при одноразовой обработке соляной кислотой и часть кислоты идет на побочные реакции. Поэтому в более кислых почвах результаты несколько завышены, а в менее кислых и нейтральных занижены.

Определение органического углерода почвы

При окислении органического углерода почвы бихроматом калия происходит восстановление четырехвалентного хрома до трехвалентного, концентрацию которого измеряют колориметрически.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Конические колбы на 100 мл
2. Пипетки на 10 и 20 мл
3. 5% раствор бихромата калия
4. 0,4 % раствор хлорида бария

5. Рабочий раствор глюкозы - 50 мг углерода на 1 мл (12,5 г глюкозы растворить в 100 мл дистиллированной воды)
6. Концентрированная серная кислота
7. Фотоколориметр

Процедура.

1. Взвесить 1 г почвы с точностью до 1 мг
2. Перенести почву в 100 мл колбу
3. Добавить 10 мл раствора бихромата и тщательно перемешать
4. Добавить 20 мл концентрированой серной кислоты и перемешать
5. После охлаждения смеси добавить 50 мл раствора хлорида бария и тщательно перемешать
6. Оставить на ночь
7. Отобрать пипеткой прозрачную надосадочную жидкость и колориметрировать при длине волны 590-600 нм
8. Параллельно с окислением углерода почвы отобрать в колбы 100 мл соответственно 0, 100, 200, 300, 400 и 500 мкл раствора глюкозы и высушить в сушильном шкафу при 105°С. Далее согласно пп. 3-7.

Расчет. Рассчитывают содержание углерода по калибровочной кривой и уравнению

$$\textbf{\% углерода} = (К_П - К_0) \cdot 0{,}1/W * 0{,}74,$$

где $К_П$ - концентрация углерода в образце, $К_0$ - концентрация углерода в холостом образце, 0,1 - конверсионный коэффциент от г/кг к %, W - масса образца, 0,74 - коррекционный коэффициент связанный с неполным окислением.

Ускоренный метод определения азота в почве и растительных остатках с помощью реактива Несслера

При сжигании органического материала в серной кислоте в присутствии перекиси водорода азот переводится в аммоний, который определяют фотоколориметрически в присутствии реактива Несслера.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Микроколбы Кьельдаля или термостойкие пробирки объемом 50 мл
2. Мерные колбы на 50 мл

3. Стеклянные воронки
4. Пипетки на 1 и 3 мл
5. Электрическая плитка с песчаной баней
6. Водяная баня
7. Штативы для колб
8. Серная кислота концентрированная
9. 30% перекись водорода
10. Фотоколориметр или спектрофотометр
12. Хлористый аммоний рабочий раствор 0,1 мг на 1 мл (0,382 г перекристализованного хлористого аммония растворяют в 1 л бидистиллированной воды)

Процедура.

1. На аналитических весах в пробирке или микроколбе Кьельдаля отвешивают 400-600 мг почвы или 100-200 мг растительных остатков или 10–50 мг остатков животных.
2. Добавляют 3 мл серной кислоты и выдерживают в течение часа.
3. После выдержки при недостатке серной кислоты добавляют еще 1-2 мл кислоты и 0,5-1 мл перекиси водорода.
4. Пробирку или микроколбу начинают осторожно нагревать на песчаной бане, постепенно доводя содержимое до кипения, и по мере кипения примерно через час осторожно добавляют еще 0,5 мл перекиси водорода.
5. Пробу озоляют до полного обесцвечивания раствора
6. После обесцвечивания пробу выдерживают еще 20 мин и затем охлаждают
7. В охлажденную пробирку добавляют около 20 мл дистиллированной воды.
8. Пробирку вновь охлаждают, и содержимое переносят количественно в мерную колбу. Почвенную пробу фильтруют.
9. Доводят раствор до метки и перемешивают содержимое. Раствор можно использовать для определения общего фосфора.
10. 2-5 мл раствора переносят в другую мерную колбу на 50 мл и приливают соответствующее количество 10% раствора NaOH для нейтрализации раствора. Нейтрализацию проверяют по лакмусовой бумаге.
11. В нейтрализованный раствор добавляют 5 мл 50% раствора сегнетовой соли.

13. Затем приливают 2 мл раствора Несслера
14. Раствор доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают
15. Окрашенный в желтый или оранжевый цвет раствор колориметрируют на фотоколориметре или спектрофотометре при длине волны 400 - 410 нм
16. Для построения калибровочной кривой готовят образцовый раствор. Для этого 10 мл рабочего раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и разводят бидистиллированной водой до метки.
17. Стандартные растворы с содержанием азота 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мг азота на 1 л готовят, перенося в мерные колбы на 50 мл соответственно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 и 25 мл образцового раствора.
18. Затем к каждой аликвоте добавляют по 5 мл 50% раствор сегнетовой соли и затем 2 мл реактива Несслера.
19. Растворы доводят до метки бидистиллированной водой, и после развития окраски колориметрируют.
20. По данным колориметрирования стандартных растворов строят калибровочный график, по которому определяют концентрацию азота в опытном растворе.

Количество проанализированных проб может при достаточном опыте достигать 40 штук на аналитика в день.

Определение нитратов и аммонийного азота в почве

Вытеснение доступных форм неорганического азота и фосфора раствором хлористого калия с последующим определением нитратов с салициловой кислотой в щелочной среде.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Полиэтиленовые бутылки на 250 мл
2. Полиэтиленовые воронки
3. Электрическая качалка
4. Пробирки на 20 мл
5. 2 М раствор KCl (149,12 г хлористого калия растворить в 1 л дистиллированной воды).
6. Раствор 4 М $NaOH$ (160 г едкого натра растворить в 600 мл дистиллированной воды и довести объем до 1 л).

7. 5% раствор салициловой кислоты в серной кислоте (5 г салициловой кислоты растворить в 95 мл серной кислоты)
8. Рабочий раствор нитрата калия (7,223 г нитрата калия растворить в 1 л дистиллированной воды). Раствор содержит 1000 мг нитратного азота.
9. Приготовить стандартные растворы, содержащие соответствеино 0, 2, 4, 6, 8 и 10 мг нитратного азота в 1 л.

Процедура.

1. Взвесить 10 г почвы (эквивалент сухой массы) в 250-мл пластиковой бутылке.
2. Добавить 100 мл раствора хлористого калия и встряхивать в течение 1 ч при 120 об./мин.
3. Профильтровать суспензию и немедленно использовать для определения аммонийного и нитратного азота и подвижного фосфора.
4. Определеиие аммоиийиого азота см. метод ускоренного определения общего азота шаги 11-15.
5. Определеиие подвижного фосфора см. Определение фосфора
6. 0,5 мл фильтрата перенести в пробирку и добавить 1 мл раствора салициловой кислоты. Немедленно перемешать и оставить на 30 мии
7. Добавить 10 мл раствора едкого иатра и оставить иа 1 час для развития окраски
8. Фотометрировать при 410 нм.

Замечание. Нитраты содержаться в дистиллированной воде и окончательную концентрацию следует корректировать по отношению к пустой пробе.

Процедуры определения нитратов в пустой пробе и стандартных растворах соответствуют шагам 5-7.

Определенне белка[2]

Белки в растворе окрашиваются раствором Кумасси G-250 и плотность окраски определяется фотометрически

Необходимое оборудование и материалы.

1. Пробирки объемом 20 мл
2. Мерные колбы на 50 мл

[2] по А. Шанько, Всероссийский Институт Агрономической Биотехнологии (Москва) "Практическая Молекулярная Биология" http://molbiol.ru

3. Гомогенизатор стеклянный
4. Качалка электрическая
5. 1 н раствор едкого натра
6. Раствор Кумасси G-250. 100 мг Кумасси G-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр. Реагент очень чувствителен к белку (1-2μg/ml). Все должно быть абсолютно чистым и посуда и бумажный фильтр и кюветы и руки, иначе раствор посинеет и его можно будет вылить. Чистый раствор Кумасси имеет коричневый цвет и синеет при наличии белка.
7. Фотоколориметр

Процедура.

1. Пробу почвы 1 г залить 5 мл раствора едкого натра и взболтать на качалке.
2. Фильтровать в мерную колбу объемом 50 мл
3. Отобрать 0,5 мл образца
4. Добавить 0,5 мл Кумасси G-250;
5. Перемешать и ждать развития окраски (от 5 мин, но не больше 30 мин);
6. Фотометрировать при длине волны 590-595 нм (в 1 мл кювете); рассчитать концентрацию белка по калибровочной кривой, построенной по альбумину

Замечание. Кюветы после каждого измерения желательно мыть спиртом, т.к. Кумасси сорбируется на стекло и завышает показания.

Определение фосфора

При восстановлении фосформолибдат аммония дает синее окрашивание раствора, которое пропорционально содержанию фосфора в растворе.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Пробирки объемом 10-20 мл
2. Пипетки объемом 0,1, 0,5, 1 и 5 мл
3. 1% раствор молибденовокислого аммония в 0,05 н серной кислоте. В мерной колбе на 1 л 10 г молибденовокислого аммония растворяют в 300 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл 1 н серной кислоты и раствор доводят дистиллированной водой до метки

4. Ацетатный буфер (pH 4,0). Готовят растворы уксусной кислоты (116 мл уксусной кислоты разводят в 1 л дистиллированной воды) и уксуснокислого натрия (164 г безводного ацетата натрия разводят в 1 л дистиллированной воды). Растворы смешивают в отношении 41:9 и доводят дистиллированной водой до 1 л.
5. Раствор аскорбиновой кислоты в сернокислой меди. В мерной колбе объемом 25 мл растворяют 60 мг $CuSO_4*5H_2O$ в 10 мл воды, добавляют 250 мг аскорбиновой кислоты и раствор доводят до метки. Используют только свежий раствор.
6. Фотоколориметр

Процедура.

1. Проба на общий фосфор готовится также как проба на общий азот (см. выше, стр. 33)
2. 0,1 мл раствора, содержащего фосфор вносят в пробирку.
3. Приливают 5 мл ацетатного буфера, 0,5 мл раствора молибденовокислого аммония и 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты.
4. Раствор выдерживают в течение 10 мин и колориметрируют при красном светофильтре.

Замечание. В качестве восстановителя вместо аскорбиновой кислоты можно использовать 2,5 % раствор хлористого олова в 10% соляной кислоте.

5. При этом пробу в 50 мл мерной колбе заливают 10 мл раствора Труога (0,3% раствор сернокислого аммония в 0,002 н серной кислоте)
6. Добавляют 2 мл 2,5% раствор молибдата аммония в 10 н серной кислоте и доводят раствор до метки дистиллированной водой
7. Приливают 3 капли раствора хлористого олова, перемешивают и через 10 мин колориметрируют при длине волны 650 нм.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ

Среди ферментов используемых в оценке качества почв внимание привлекают дегидрогеназы, фосфатазы, бета-глюкозидаза, уреаза, целлюлаза (Dick, 1997). Поэтому определение активности именно этих ферментов будет рассмотрено ниже. Методики описаны по Ф.Х. Хазиеву (1986) с изменениями.

Определение активности дегидрогеназы

Метод основан на восстановлении в присутствии дегидрогеназы трифенилтетразолия до формазана в анаэробных условиях. Наиболее простой метод предложен К.А. Козловым и Э.Н. Михайловой:

Необходимое оборудование и материалы.

1. Стеклянные ценрифужные пробирки объемом 10 мл
2. Пипетки 5 мл
3. 0,1% водный раствор 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (ТТХ)
4. Вазелиновое масло стерильное
5. Рабочий раствор формазана в толуоле 2мг/мл (Приготавливают восстановлением 2 мл раствора ТТХ кристалликом гидросульфита натрия. Осадок формазана растворяют в 10 мл толуола. Из этого раствора приготавливают растворы формазана с концентрациями от 0,01 до 0,1 мг на 1 мл толуола).
6. Фотоколориметр
7. Центрифуга
8. Термостат

Процедура.

1. В центрифужную пробирку помещают 1 г почвы
2. Добавляют 5 мл раствора ТТХ и заливают сверху стерильным вазелиновым маслом.
3. Пробирки инкубируют в термостате в течение 24 часов при 29^{O}C
4. После инкубации в пробирку добавляют 6 мл толуола
5. Пробирку осторожно встряхивают для экстракции образовавшегося формазана и центрифугируют в течение трех минут.
6. Надосадочную жидкость сливают в кювету и колориметрируют с синим светофильтром (485 нм) против холостого опыта с реакционной смесью без почвы.
7. Корректируют к результатам контроля со стерильной почвой.

Расчет результатов ведется по формуле:

$$X = a*v*150{,}35,$$

где X – количество водорода в мкл на 1 г почвы за 24 часа, a – концентрация формазана в растворе, v – объем раствора, равный 11 мл и 150,35 – пересчетный коэффициент соответствующий 150,35 мкл водорода на 1 мг отщепившегося формазана.

Определение активности нивертазы

Метод осиован иа гидролизе ферментом сахарозы иа молекулы глюкозы, определяемой при помощи антроиового реактива

<u>*Необходимое оборудование и материалы.*</u>

1. Конические колбы или пробирки на 25 мл
2. Пипетки на 2,5 и 5 мл
3. Толуол
4. Ацетатный буфер (4,7). В мерной колбе 250 мл к 50 мл 1 н раствора уксуснокислого натрия добавляют 20 мл 1 н раствора соляной кислоты и доводят дистиллированной водой до метки
5. 3% раствор сахарозы
6. Антроиовый реактив. К 5 мл дистиллированной воды прибавляют 100 мл концентрированиой серной кислоты и после охлаждеиия виосят 200 мг антроиа. Реактив оставляют на льду в течение 4 часов. Примеияют только свежеприготовленный реактив.
7. Алюминиевая фольга или Парафильм
8. Фотоколориметр
9. Термостат

<u>*Процедура.*</u>

1. Взвешивают 1 г почвы в колбе 50 мл
2. Вносят 0,2 мл толуола и 5 мл раствора сахарозы
3. Колбу закрывают алюминиевой фольгой или Парафильмом и инкубируют 24 ч при 30^{o}C
4. После инкубации приливают 25 мл воды и фильтруют
5. Из фильтрата отбирают 2,5 мл, добавляют 5 мл антронового реактива, перемешивают.

6. Через 15 мин определяют концентрацию редуцирующих сахаров на фотоколориметре с красным светофильтром (625 нм)

Определение активности бета-глюкозидазы

Метод основан на отщеплении салигенина от салицина под действием фермента и образованием в щелочной среде при pH 9,6 индофенола в присутствии 2,6-диброхинонхлоримида.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Конические колбы на 50 мл
2. Мерные колбы на 50 и 100 мл
3. Раствор салицина (1,1532 г чистого салицина растворяют в 1 л дистиллированной воды). 1 мл раствора эквивалентен 50 мг салигенина.
4. Ацетатный буфер (pH 6,2). Готовят раствор уксусной кислоты (120 мл уксусной кислоты разводят в 1 л дистиллированной воды) и раствор уксуснокислого натрия (164 г безводного ацетата натрия разводят в 1 л дистиллированой воды). Растворы смешивают в отношении 1:32 и доводят до pH 6,2.
5. Боратный буфер (pH 9,6). 50 мл 0,05 М раствора буры (19,05 г $Na_2B_4O_7*10H_2O$ в 1л дистиллированной воды) смешивают 23 мл 0,2 М раствора едкого натра и доводят объем раствора до 200 мл дистиллированной водой.
6. 20% раствор едкого натра
7. Толуол
8. 0,2% раствор 2,6-дибромхинонхлоримида
9. Рабочий раствор фенола. 100 мг фенола растворяют в 1 л дистиллированой воды. Хранят в темной посуде.
10. Стандартные растворы индофенола эквивалентные 0, 10, 50, 100 и 150 мкг салигенина в 3 мл. Рабочий раствор фенола разводят в 10 раз и в 5 приготовленных мерных колб на 100 мл с 67 мл ацетатного буфера в каждой добавляют соответственно 0; 2,52; 12,63; 25,26 мл приготовленного раствора и в последнюю 3,79 мл рабочего раствора фенола. Растворы доводят дистиллированной водой до метки. Отбирают по 3 мл стандартного раствора и окрашивают подобно исследуемому раствору по ниже указанной методике.
11. Фотоколориметр

12.Термостат

Процедура.

1. 10 г почвы (эквивалент сухой массы) взвешивают в конической колбе иа 50 мл и обрабатывают 1,5 мл толуола.
2. Через 15 мин добавляют 10 мл раствора салициииа и 20 мл ацетатного буфера.
3. Пробу помещают в термостат при 37^{O}C иа 3 часа.
4. После инкубации пробу фильтруют через плотный фильтр.
5. Отбирают 5 мл фильтрата в мерную колбу иа 50 мл и добавляют 2 мл боратного буфера.
6. После краткого перемешивания добавляют 0,5 мл раствора дибромхиионхлоримида и тщательно перемешивают.
7. Раствор выдерживают в течеиие часа при комнатной температуре.
8. После выдержки раствор доводят до метки. Голубая окраска стабильиа в течеиие 1,5 часов
9. Измеряют экстинкцию против воды при длиие волны 578 им в кювете 2 см.
10. Стандартные растворы окрашивают согласио шагам 5-9, но используют 3 мл раствора.

Определение активиости целлюлазы

Метод основан иа расщеплении целлюлозы под действием комплекса целлюлаз до глюкозы. При этом активиость C_1-целлюлазы совместно с эндоклюканазой определяется при разрушении микрокристалической нерастворимой целлюлозы, а эндоглюканазы - при расщеплении растворимой карбоксиметилцеллюлозы.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Конические колбы объемом 50-100 мл
2. Стеклянные пробирки объемом 20 мл
3. Мериые колбы объемом 50 мл
4. Стеклянные воронки
5. Мерные пипетки объемом 10 мл
6. Бумажные фильтры
7. Толуол
8. Микрокристалическая целлюлоза
9. Карбоксиметилцеллюлоза 1% раствор

10. Ацетатный буфер (pH 5,5). 4,8 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты (11,55 мл уксусной кислоты в 1 л дистиллированной воды) смешивают с 45,2 мл 0,2 М раствора ацетата натрия (16,4 г безводного или 27,2 г трехводного ацетата натрия в 100 мл дистиллированной воды) и объем смеси доводят дистиллированной водой до 1 л.
11. Алюмокалиевые квасцы
12. Антроновый реактив
13. Водяная баня
14. Фотоколориметр
15. Термостат

Процедура.

1. В конической колбе взвешивают 10 г почвы (в пересчете на сухую массу) и обрабатывают ее 1,5 мл толуола
2. Вносят субстрат (смесь 5 мл ацетатного буфера и 5 мл 1% раствора карбоксиметилцеллюлозы или 10 мл ацетатного буфера, содержащего 50 мг микрокристалической целлюлозы)
3. Смесь перемешивают и помещают в термостат при $37^{\circ}C$.
4. Время инкубации смеси в случае карбоксиметилцеллюлозы 24 ч, в случае микрокристалической целлюлозы 5 суток
5. Реакцию прерывают опусканием колбы в водяную баню с кипящей водой
6. В колбу добавляют 0,3 г алюмокалиевых квасцов.
7. Содержимое колб фильтруют в мерные колбы. Фильтрат доводят до метки
8. Отбирают 2 мл фильтрата в пробирку и заливают 4 мл антронового реактива
9. Раствор энергично перемешивают
10. Через 15 мин определяют концентрацию редуцирующих сахаров на фотоколориметре с красным светофильтром (625 нм)
11. Параллельно ставят контрольный опыт с почвой без субстрата

Определение активности уреазы

Образовавшийся при гидролизе мочевины аммиак определяют колориметрически с реактивом Несслера

Необходимое оборудование и материалы.

1. Колбы конические объемом 100 мл

2. Мерные колбы объемом 50 мл
3. Стеклянные воронки
4. Бумажные фильтры
5. 2% раствор мочевины в фосфатном буфере (pH 6,7). Фосфатный буфер готовят, смешивая 56,5 мл раствора однозамещенного фосфата натрия (27,8 г NaH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды) и 43,5 мл раствора двузамещенного фосфата натрия (71,7 г $Na_2HPO_4*12H_2O$ в 1 л дистиллированной воды). Объем раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой.
6. Толуол
7. 50% трихлоруксусная кислота
8. 1 М раствор хлористого калия
9. Реактив Несслера
10. 50% раствор сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый)
11. Фотоколориметр
12. Термостат

Процедура.

1. В 100 мл-колбе взвешивают 5 г почвы и обрабатывают 0,2 мл толуола
2. Добавляют 20 мл раствора мочевины в фосфатном буфере и инкубируют в течение 4 ч при 37°С
3. После инкубации вносят 1 мл 50% трихлоруксусной кислоты для прекращения реакции
4. Содержимое колб фильтруют и отбирают 2 мл фильтрата в мерную колбу 50 мл
5. Последовательно добавляют в колбу 30 мл дистиллированной воды, 2 мл раствора сегнетовой соли и 2 мл реактива Несслера
6. Содержимое колбы доводят до метки
7. Окрашенный раствор через 10 мин колориметрируют при длине волны 400 нм

Определение активности фосфатаз (фосфомоноэстераз)

Отщепившийся при гидролизе от п-нитрофенолфосфата п-нитрофенол определяют колориметрически

Необходимое оборудование и материалы.

1. Конические колбы объемом 50 мл
2. Мерные пипетки объемом 25 мл

3. 0,5% раствор п-нитрофенол-фосфата в этаноламинацетатном буфере (рН 5,4 для определения кислых фосфатаз, 8,0-для определения щелочных фосфатаз). Ряд авторов предлагает использование буфера с рН 7,0 для оценки нейтральной фосфатазы и 10,0 для оценки щелочной фосфатазы. Этаноламинацетатный буфер готовится из смеси 0,2 М раствора этаноламина (12,2 г этаноламина в 1000 мл воды) и 0,1 н раствора уксусной кислоты. Буфер с рН 5,4 готовится из 25 мл первого раствора и 65 мл второго раствора, с рН 7 смешением 25 мл и 52 мл соответственно, с рН 8 – 25 мл и 50 мл и рН 10 – 25 и 5 мл соответственно. После смешивания общий объем смеси доводится дистиллированной водой до 100 мл.
4. 1 н раствор КОН
5. Стандартные растворы п-нитрофенола
6. Бумажные фильтры
7. Фотоколориметр
8. Термостат

Процедура.

1. Навески почвы массой 1 г (в эквиваленте сухой массы) заливают в колбе 3 мл раствора п-нитрофенилфосфата в соответствующем буфере (в оригинальном методе использованы буферы с рН 5,4 и 8).
2. Пробы выдерживаются в термостате в течение 30 мин при температуре 30^{0}С.
3. После инкубации в пробу добавляют 22 мл дистиллированной воды, взбалтывают и фильтруют через бумажный фильтр.
4. По каплям добавляют раствор едкого кали до развития окрашивания. рН раствора должно быть 8,6
5. Плотность окраски измеряют при длине волны 450-480 нм
6. Параллельно ставят контроль с почвой без субстрата и с субстратом без почвы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЫХАНИЯ ПОЧВЫ

Дыхание почвы оценивается по количеству выделенного за определенный период времени CO_2 при помощи самых различных методов, из которых наиболее простым является метод поглощения выделенного углекислого газа титрованным раствором щелочи с последующим титрованием кислотой.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Бутыли на 250 мл с плотно завинчивающейся крышкой
2. Пластиковые пробирки (центрифужные) или полиэтиленовые пакеты с отверстиями.
3. Бюретки с автоматической установкой нуля
5. 0,1 н раствор NaOH
6. 0,5 М раствор $BaCl_2$
7. 0.1 н раствор HCl
8. 1% спиртовой раствор фенолфталеина

Процедура.

1. 15 г почвы, увлажненной до 60% максимальной водоудерживающей емкости, помещают в пробирку.
2. В бутыль на дно наливают 20 мл раствора щелочи, вставляют пробирку в горлышко бутыли и бутыль завинчивают крышкой.
3. Бутыль выдерживают при температуре 25^{o}C в течение 4 часов.
4. Осторожно вынимают пробирку с почвой, и немедленно вносят 42 мл раствора хлористого бария для осаждения CO_2.
5. Щелочь титруют раствором кислоты в присутствии фенолфталеина до исчезновения розовой окраски.
6. По разнице между исходным и конечным титром раствора щелочи устанавливают количество поглощенного углекислого газа, которое пересчитывают на объем газа в час на 1 г почвы.

Rowell (1995) предложил колориметрический метод оценки дыхания почвы на основе окрашивания раствора крезолового красного при внесении CO_2.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Пробирки для отбора крови или стеклянные бутылочки объемом 25 мл с толстыми полипропиленовыми пробками.
2. Раствор крезолового красного (4 мМ раствор $NaHCO_3$ смешивают с равным объемом 0,2 мМ раствора KCl и вносят 10 мкг крезолового красного на каждый мл полученного раствора). Смесь хранят в плотно закрытом сосуде.
3. Шприцы объемом 2-5 мл для отбора газа.

4. Сосуды для инкубирования почвы, объемом превышающим объем пробы примерно в 20 раз (от 25 мл для проб, эквивалентных 1 г сухой почвы до 1000 мл для проб, эквивалентных 50 г сухой почвы) с плотными пропиленовыми пробками.
5. Дистиллированная вода
6. Фотоэлектроколориметр с кюветами 1 см

Процедура.

1. Образец массой эквивалентной 50 г абсолютно-сухой почвы вносится в 1 л сосуд, смачивается до 60% водоудерживающей способности и запечатывается не пропускающей газ пробкой
2. Сосуд инкубируется в течение 16 ч при температуре 22^{O}C.
3. После периода инкубации сосуд встряхивают и отбирают из него шприцем 2 мл воздуха
4. В предварительно подготовленную пробирку вносится 3 мл смеси с крезоловым красным, пробирка плотно закрывается пробкой и 3 мл воздуха отбирается из нее шприцем.
5. Проба измеряемого воздуха вносится в пробирку через пробку.
6. Окраска развивается или при 4-х кратном перемешивании в течение 30 минут, или при выдерживании пробирки в течение ночи при температуре 20^{O}C.
7. Окраска остается стабильной в закрытой пробирке в течение нескольких дней
8. Окрашенный раствор измеряют в фотоколориметре или спектрофотометре при длине волны 572 нм непосредственно в пробирке или в кювете. При измерении в открытой кювете замер делается в течение 2 мин.
9. Калибровочную кривую строят на основе использования стандартных смесей газов или приготавливая смеси с разным количеством CO_2. При этом используют $CaCO_2$ или раствор $NaHCO_3$ в сосудах известного объема, подкисляя их раствором кислоты. Содержание газа в таких смесях калибруют каким-либо иным методом. Расчет, делается исходя из объема воздуха в сосуде с инкубируемой почвой.

Замечания. При продувании пробирок, содержащих индикаторную смесь, азотом или свободным от углекислого газа воздухом минимально измеряемое количество углекислого газа равно 0,5 мкг. При отсутствии продува – 5 мкг.

Автор метода указывает, что, возможно, использовать этот метод и для измерения субстрат индуцированного дыхания после 2 ч инкубации при 22^{0}C. При такой чувствительиости метода можио использовать и пробы меньшего объема порядка 5-10 г. При образцах порядка 1 г иеобходимо использовать предварительный продув азотом пробирок для измерения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОЧВЫ НА ОСНОВЕ СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ

Субстраты разиой химической природы используются для индуцирования микробного дыхания в почвенных образцах (Degens, Harris, 1997), профили которого сравниваются для оценки функциональиого разнообразия.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Необходимое оборудование и материалы для измереиия дыхания на основе выделения CO_2
2. Растворы 15 мМ следующих аминокислот: аспарагина, лизииа, феиилаланина, тирозина, серина, цистеина, аргинина, глютамовой кислоты, лейцииа, гистидина
3. Растворы 15 мМ аминов: N-метил-глюкамина, глютамина, глюкозамина
4. Раствор 15 мМ сукцинамида
5. Раствор 15 мМ урокановой кислоты
6. Растворы 75 мМ глюкозы и маннозы
7. Растворы 30 мМ Твин80 и альфа-циклодекстрина
8. Растворы 190 мМ следующих карбоксильиых кислот и их солей: альфа-кетоглутаровой, альфа-кетобутировой, щавелевой, фумаровой, малоновой, цитрата и формиата натрия, мочевой, альфа-кетовалериановой, аскорбииовой, виннокаменной, яблочной, глюкоиовой, альфа-гидроксибутировой, янтарной, хинной, пантотеновой
9. Дистиллированная вода

Процедура.

1. Предварительио воздушно-сухую почву смачивают дистиллированной водой в соотношении 1 мл воды иа 2 г почвы и кондиционируют при 20°C в течение иедели
2. После коидиционирования почву перемешивают и делят в зависимости от числа испытываемых субстратов на 6-37 иавесок по 6 г
3. Каждую иавеску заливают 2 мл одиого из указанных растворов и выделеиие CO_2 измеряется одним из методов оценки почвеиного дыхания. Максимум выделеиия CO_2 иаблюдается через час инкубации при 25°C.
4. Физиологический профиль дыхаиия может быть проанализирован разными методами статистического анализа.

Замечание. В исходной методике используется навеска почвы массой эквивалентной 1 г сухой массы почвы, которую помещают в 27,7 мл сосуды МакКартни и заливают 2 мл субстрата. Сосуды иемедленно запечатывают пробками и инкубируют в течение 4 часов при температуре 25°C, перемешивая пробу в течеиие 1 минуты через 2 часа инкубации и за 1 мин до конца инкубации и непосредственио перед взятием пробы. Пробы газа объемом 0,5 мл отбираются шприцом и содержание CO_2 измеряется в газоаиализаторе.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ГРИБОВ ПО СОДЕРЖАНИЮ В ПОЧВЕ ЭРГОСТЕРОЛА[3]

Эргостерол почвеииых грибов мобилизуется КОН, экстрагируется n-гексаном в делительиой вороике, высушивается при 40°C в крутящемся испарителе и затем растворяется в метаиоле. Содержание эргостерола определяется в жидкостном хроматографе высокого разрешеиия (HPLC) при длине волны 282 мкм. Это модифицированный метод Целлеса с соавт. (Zelles et al., 1987).

Необходимое оборудование и материалы.

1. HPLC с колонкой RPC-18 и ультрафиолетовым детектором
2. Вращающийся испаритель
3. Стеклянный холодильник

[3] по X. Рёссиеру из: Schiner et al., 1996.

4. 250-мл делительиая вороика
5. Держатель фильтров
6. Мембранные фильтры (ячея 0,45 мкм)
7. Метанол, ч.д.а.
8. Этанол, х.ч.
9. n-гексан, ч.д.а.
10. KOH
11. Мобильная фаза для HPLC. Добавить 50 мл дистиллированиой воды в 950 мл метанола. Дегазировать раствор в ультразвуковой ванне.
12. Рабочий раствор эргостерола (200 мкг иа мл). В 100-мл мериой колбе с метанолом растворить 20,4 мг эргостерола (иапример, Fluka 45480). Раствор можно хранить при 4°C в бутылке из темного стекла в течеиие нескольких дней.

Процедура.

1. Взвесить 2 г естествеиио влажиой почвы, поместить в 100 мл испарительную колбу и поставить во вращающийся испаритель.
2. Добавить 2 г KOH, 20 мл метанола и 5 мл этанола. Смесь кипятить 30 минут при температуре 70°C с использованием обратного холодильника. Постояиио взбалтывать смесь.
3. Дать смеси остыть и добавить 5 мл дистиллированной воды. Слить чистую часть раствора через делительную воронку, а остаток промыть два раза 20 мл метаиола.
8. Переиести иадосадочную жидкость в делительную вороику. Из жидкости в делительиой воронке, после взбалтывания в течение 1 минуты с 30 мл n-гексана, выпарить гексановую фракцию во вращающемся испарителе при 40°C.
9. Остаток залить 2 мл метанола.
10. После фильтрации раствора сквозь мембранный фильтр определить содержание эргостерола на HPLC, используя колоику C-18 с обратной фазой, 95% метанол как мобильную фазу при скорости потока 1 мл в минуту. Время удержаиия для эргостерола составляет 13,5 минут. Для определения использовать ультрафиолетовый детектор с длииой волны 282 или 290 им.

Определение содержания эргостерола в каждом образце следует проводить не менее двух раз.

11. Чтобы построить калибровочную кривую, необходимо ввести 0 (холостая проба), 1 и 2 мл стандартного раствора соответственно в 100 мл мерную колбу и довести объем до 100 мл метанолом. Калибровочные стандарты соответствуют концентрациям эргостерола в 0, 1, 2 и 4 мкг эргостерола на мл.

Расчет. Содержание эргостерола пересчитывается на грамм сухого вещества почвы, исходя из содержания эргостерола в грибах 0,7-1% сухой массы. Однако авторы метода считают, что стоит приводить данные по канцентрации эргостерола в почве, а не пересчет на сухую массу грибов. Это связано с тем, что концентрация эргостерола зависит от вида гриба, и в глинистых почвах выход эргостерола ниже, чем в легких почвах. Калибровочная кривая строится на основе стандартных растворов и соответствующих пиков на хроматограмме HPLC.

Окончательный расчет производится по формуле:

(S*100)/ %сухой массы = мкг эргостерола на 1 г сухой массы почвы,

где S – среднее значение концентрации эргостерола для образца (мкг)

$100*\%^{-1}$сухой массы – переводной коэффициент для сухого вещества почвы.

Замечание. Эргостерол фоточувствителен. Таким образом, измерения его содержания должны проводиться сразу же после гидролиза. В противном случае экстракт должен храниться в темных стеклянных емкостях при температуре 4°С. Содержание эргостерола в почве напрямую зависит от грибной биомассы. Но для определения абсолютных значений грибной биомассы в почве по содержанию эргостерола, необходима калибровка с помощью прямых методов учета.

Для абсолютных измерений и калибровки рекомендуется эргостерол дважды перекристаллизовать в этаноле, сушить над силикагелем с индикатором и хранить в метаноле. Хранить в темном сухом защищенном месте до использования.

Для почвенных навесок массой 1-5 г высвобождение эргостерола прямо пропорционально биомассе грибов.

Увеличение времени гидролиза не приводит к повышению концентрации эргостерола. Однако повторный гидролиз увеличивает его концентрацию на 12% (Zelles et al., 1987).

Время удерживания для эргостерола было определено с гиперсилом 5-мкм колонкой С-18 (Шендон, 250*4,6 мм). Когда используются другие марки, время удерживания может варьировать. Допускается использование более коротких колонок (например, 125*4,6 мм). В таком случае интенсивность потока может быть увеличена до 1,5 мл в минуту (Zelles et al., 1987).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИАЛЬНОГО АЗОТА И УГЛЕРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ФУМИГАЦИИ ХЛОРОФОРМОМ

При фумигации почвы (подстилки) хлороформом происходит гибель и лизис микробиальных клеток, содержимое которых может быть экстрагировано 0,5 М раствором сульфата калия, с последующим определением в растворе углерода и азота и других компонентов

Необходимое оборудование и материалы.

1. Бутыли с завинчивающимися пробками (200 мл)
2. Качалка или встряхиватель для колб и пробирок
3. Фильтровальная бумага
4. Стеклянные воронки
5. Стеклянные лабораторные стаканчики (100 мл)
6. Эксикаторы с краном
7. Увлажненные бумажные полотенца
8. Мелкий гравий или стеклянные шарики для предотвращения бурного кипения
9. Карбонат натрия в гранулах
10. Полиэтиленовые пузырьки с завинчивающейся крышкой
11. 0,5 М раствор K_2SO_4
12. Хлороформ (Merck, Darmstadt, Nr. 2445, стабилизированный 20 ppm 2-метил.2.бутаном), пропущенный через колонку с окисью алюминия для освобождения от этанола.
13. Вакуумный насос для откачки воздуха из эксикатора.

Процедура.

1. Почву просеять через сито 2 мм.
2. Из гомогенизированной почвенной пробы взять 2 образца по 60 г влажной массы для минеральной почвы или 2 образца по 3 г для подстилки.

А) Нефумигированные пробы

3. К каждой пробе немедленно добавить 80 мл или 90 мл 0,5 М раствора K_2SO_4 для минеральной почвы или подстилки соответственно. Встряхивать на качалке в течение 30 мин. (частота 250 об./мин.).
4. Получившуюся суспензию отфильтровать. Полученный фильтрат залить в полиэтиленовые пузырьки. Пустые контрольные пробы также подвергаются фильтрации. Для каждой пробы требуется 2 пузырька.
5. Пузырьки можно либо заморозить в случае длительного хранения до измерения, либо хранить на протяжении четырех недель при температуре 4°С.

Б) Фумигированные пробы

1. Второй образец помещается в эксикатор (вытяжка обязательна!). В эксикатор также ставится одна контрольная проба без почвы/подстилки. Она служит пустым образцом. Маркировать пробы только с помощью простого карандаша.
2. На дно эксикатора под керамический диск кладется увлажненная фильтровальная (или салфеточная) бумага. Также туда ставится стаканчик с гранулированным карбонатом натрия, насыпанным слоем в 1 см. К пробам ставится стаканчик с приблизительно 40 мл хлороформа и частичками гравия или стеклянными шариками.
3. Края крышки и чаши эксикатора и канал краника на крышке смазать силиконовой смазкой. Откачать воздух насосом до давления, при котором хлороформ начнет интенсивно кипеть.
4. Закрыть краник эксикатора и выдержать эксикатор в темноте в течение 24 часов при температуре 20°С.
5. Осторожно сбросить давление и открыть эксикатор. Вынуть стаканчик с хлороформом, чашку с карбонатом натрия и увлажненную бумагу (гравий и карбонат натрия можно использовать еще раз после отстаивания под вытяжкой). Для освобождения проб от остатков хлороформа поместить их в другой эксикатор.
6. Последовательно откачивать из эксикатора воздух (в течение 2 минут) и осторожно наращивать давление десять раз или более, чтобы избавиться от паров хлороформа. Операцию повторять, пока весь хлороформ не улетучится. Через каждые 5 откачек смазывать крышку и краник эксикатора.

7. После этого обработать и хранить пробы согласно процедуре для нефумигированных проб. Стивенсон и Коул (Stevenson, Cole, 1999) указывают, что под вытяжкой можно и не ждать пока хлороформ улетучиться, а сразу же начинать экстракцию.

Определение микробиального углерода и азота в полученных растворах

Углерод и азот в вытяжке можно определить методами, описанными выше (стр. 32 и стр. 33). Существует автоматическое определение углерода и азота с помощью например «Continuous Flow System» фирмы Perstorp Analytical GmbH или аналогичной системы. Здесь описана методика и принцип работы установки фирмы Perstorp.

А) Определение микробиального азота в растворах.

Для перевода растворенного азот в форму нитратов пробы обрабатываются в течение 9 мин. насыщенным раствором $K_2S_2O_8$. Затем в приборе в течение 15 минут пробы облучаются ультрафиолетом. Для удаления красящих веществ проба пропускается через мембранный фильтр и кадмиевый катализатор. После такой обработки нитраты превращаются в нитриты. Затем, соединяясь с сульфаниламином.дигидрохлоридом, нитриты образуют окрашенное вещество. Интенсивность окраски измеряется при длине волны в 540 нм.

Б) Определение микробиального углерода в растворах.

Чтобы перевести неорганический углерод в CO_2, проба подкисляется 1 н раствором H_2SO_4. Далее с помощью полупроницаемой трубки CO_2 удаляется из раствора при контакте с 1 н раствором NaOH. К освобожденным от неорганического углерода пробам добавляется раствор $K_2S_2O_8$. При этом углеродные связи в органики окисляются до CO_2. Для гарантированного полного окисления пробы облучают ультрафиолетом. Контроль окисления осуществляется с помощью раствора фенолфталеина, отделенного от подкисленной пробы полупроницаемой пленкой силиконовой мембраны, которая отделяет CO_2 от подкисленного раствора. Интенсивность окраски индикатора пропорциональна концентрации органического углерода и измеряется в фотометре при длине волны 550 нм.

Расчет. Расчет концентраций микробиальиого азота и углерода осуществляется по следующей формуле:

m N (соотв. C) / CM почв = MW * (V(K_2SO_4) + V (H_2O)) / (1000 * CM навески), где m N – масса азота (соотв. углерода) в фумигированной или нефумигированной пробе; CM – Сухая масса почвы и навески (г); MW – измеренная величина (ppm); V – объемы почвенной воды и раствора K_2SO_4.

Расчет запасов микробиального азота и углерода осуществляется по формулам:

N мик. = (N фумигироваииой пробы – N иефумигироваииой пробы) * 2,22 (мгN/мгCM почвы);

C мик. = (C фумигироваииой пробы – C иефумигироваииой пробы) * 2,22 (мгC/мгCM почвы).

Поправочный коэффициент рассчитан согласно результатам Дженкинсона (Jenkinson, 1988) и Ву с соавторами (Wu et al., 1990).

ОЦЕНКА РАЗВИТИЯ ЭКТОМИКОРИЗЫ НА КОРНЯХ

Корни отмываются от почвы и окрашиваются после обработки молочной кислотой красителем. После окрашивания можно проводить исследование особенностей симбионтов

Окрашиваиие микоризы молочиой кислотой[4]

Необходимое оборудование и материалы.

1. Стаканы объемом 50 мл
2. Чайные сита
3. 5% раствор KOH
4. 1% раствор HCl
5. Краситель: смесь 875 мл 90% молочной кислоты (ч.д.а.), 63 мл глицерина, 0,1 г фуксина
6. Удалитель красителя: состав тот же, что и красителя, но без фуксина.
7. Основиой раствор H_2O_2: смесь 3 мл NH_4OH, 30 мл 10% раствора H_2O_2 и 567 мл водопроводной воды. (Применять только свежеприготовленный раствор!)

[4] по: Kormanik & McGraw, 1984

8. Консервирующая жидкость: 1 л глицерина, примерно 0,5 мл 5Н (3,7%) раствора HCl и 0,5 мл дистилированной воды.

Для полного покрытия корней в лабораторном стаканчике требуется около 30 мл раствора.

Процедура.

С пробами обращаться осторожно, чтобы не нарушить внешние структуры микоризы. Последовательность проб всегда обрабатывать в одном и том же порядке.

1. Корни из одной цельной пробы осторожно отмыть от субстрата и переместить в 100 мл стаканчик.
2. Залить корни 5% КОН и подержать 3 минуты на водяной бане (температуры воды – 100°С, вода должна кипеть, когда в нее опускаются стаканчики). Раствор КОН вливать по ложке.
3. Снять с бани. Дополнить стаканчики водопроводной водой, и оставить корни на 5 минут. Затем откинуть корни на чайное сито и ополаскивать их водой, пока стекающая с корней вода не потеряет коричневатый оттенок.
2. Корни положить обратно в стаканчик и залить основным раствором перекиси водорода.
3. Оставить стоять при комнатной температуре на 10-20 минут или пока корни не обесцветятся (если корни очень светлые сами по себе, то от отбеливания можно отказаться). Затем откинуть корни на чайное сито, чтобы дать стечь жидкости.
4. Перед окрашиванием поместить корни на 3-4 минуты в 1% раствор HCl, затем откинуть корни на сито.
5. Подкисленые корни без предварительного обмывания залить красящим раствором 0,01% фуксина и поставить на водяную баню на 3 минуты. Затем откинуть корни на чайное сито.
6. Поместить корни в удалитель красителя. В этом растворе корни будут храниться. В качестве альтернативы удалитель красителя можно слить через 20 минут. В таком случае надо залить корни консервирующей жидкостью. Подержать стаканчики на водяной бане в течение пол-минуты, чтобы глицерин

разогрелся и проник глубже в корни. При снятии с водяной банн стаканчики слегка поболтать.

7. Обработанные таким образом пробы могут храниться до 1 года при комнатной температуре.

Определеиие степени развития микоризы[5]

Необходимое оборудование и материалы.

1. Счетные предметные стекла, расчерченные по горизонтали через 5 см и по вертикали через 10 см.
2. Покровные стекла.
3. Пинцеты.
4. Энтомологические иголки.
5. Микроскоп.

Процедура.

1. Отобрать 25 фрагментов корней из пробы н поместить нх на предметное стекло. Разместить их на стекле так, чтобы каждый фрагмент занимал одну клетку разметки на стекле.
2. Видимые фрагменты корней просматриваются на предмет отсутствия/присутствия микоризы. Фиксируется степень покрытия микоризой в баллах (по десятибалльной шкале или в % от покрытия корня).
3. Затем рассчитывается общая площадь участков корней, покрытых микорнзой.

Замечание. Определение степени развития микоризы производится при рабочих увеличениях 100, 250 и 400х. Наиболее точная оценка степени развнтия микоризы на фрагментах корней получается при переключенин с одного увеличения на другое.

ВЫДЕЛЕНИЕ РАКОВИННЫХ АМЕБ ИЗ ПРОБ

Раковинные амебы окрашиваются красителем и подсчитываются под микроскопом

Необходимое оборудование и материалы.

1. Стаканчики для отбора проб объемом 20 мл.

---

[5] Метод световых препаратов (Giovanetti, Mosse, 1980)

2. Нож

3. Конические колбы объемом 100, 250 н 500 мл.

4. Мерные цилиндры объемом 500 и 200 мл

5. Весы аналитические с точностью взвешивания не менее 1 мг.

6. Качалка или встряхиватель для колб.

7. Почвенные сита с ячеей 1 и 0,5 мм

8. Предметные стекла

9. Микроскоп с увеличением до 400 х н окуляром с мерной лннейкой.

10. Глицерин

11. Эритрозин карболовый (1% раствор эритрозииа в 5% карболовой кислоте)

Процедура.

1. Почву из разных частей почвенной пробы отбирают ножом и переносят в стаканчнк для взвешивання.
2. Взвешенную на аналитических весах пробу нз стаканчика переносят в колбу объемом 500 мл, заливают 250 мл воды и отстаивают в течение иескольких часов для размокания и разрушения почвенных агрегатов.
3. После размокания агрегатов колбу встряхивают на качалке в теченне 10 мин.
4. Полученную суспеизию, взбалтывая, пропускают сначала через сито с ячеей 1 мм, затем через сито с ячеей 0,5 мм (диаметр сит 8 см) для отделеиия крупных растительных остатков и минеральных частиц.
5. Отделенные крупные растительные и минеральные частицы вторично заливают водой, взбалтывают н вновь пропускают через сито с ячеей 0,5 мм. Полученную почвенную суспензию объединяют с ранее полученной в результате предыдущих процедур
6. Почвенную суспензию отстаивают в течение суток и доводят до объема 300 мл для проб из гумусово-аккумулятивных горизонтов. Прн иеобходимости пробы центрифугируют (Tolonen, 1986). Для проб из органогениых горнзонтов (L, F, H) объем воды составляет 50 или 100 мл.
7. Пробу гомогенизируют эиергичным встряхиванием и микропипеткой 0,1 мл отбирают получеииую суспеизию нз середины колбы.

8. Аликвоту переносят на предметное стекло и распределяют в виде 2 капель в каплю глицерина с каплей эритрозина карболового для окрашивания цитоплазмы простейших.
9. Капли равномерно перемешивают и распределяют по площади равной площади покровного стекла размером 24х24 мм. Живые амебы окрашиваются в интенсивно малиновый цвет.
10. Почвенную суспензию из органоминеральных горизонтов после перемешивания разделяют на две части - 250 и 50 мл.
11. Часть объемом 50 мл доводят до 100-150 мл в зависимости от первоначальной массы почвы.
12. Из части объемом 250 мл отбирают 50 мл, и этот объем доводят также до 100-150 мл.
13. Из обеих колб микропипеткой отбирают почвенную суспензию для микроскопирования. Подготовку см. пп. 8 и 9.
14. Во всех случаях просматривают не менее 2-х препаратов.
15. Объем выборки раковинных амеб для каждой почвенной пробы доводят до 300 экз. В редких случаях при низкой плотности раковинных амеб объем выборки составляет 100 экз.
16. Рабочее увеличение при микроскопировании обычно 200 х, для уточнения деталей морфологии мелких раковинок и раковинок рода *Euglypha* используют увеличение 400х.
17. Пересчет численности раковинных амеб на пробу проводят, исходя из объема суспензии, взятой для микроскопирования, разведения или серии разведений.

Подсчет биомассы раковинных амеб. В основе всех способов определения биомассы раковинных амеб лежит расчетный метод, основанный на подсчете живых клеток, вычислении их объема и удельной массы клетки. При определении годовой продукции обязательно должен быть учтен короткий срок жизни простейших, обусловливающий постоянное обновление биомассы за счет все новых поколений.

Подсчет биомассы разными исследователями проводился различными способами. Так Volz (1951), приводит вес 106 тестаций некоторых видов от таких крупных как *Arcella discoides* до мелких - *Cryptodifflugia vurgalis*, равным 61,4 мг

с учетом веса минеральной массы и веса цитоплазмы. Такой способ ведет к завышению результатов.

Heal (1965) предложил рассчитывать биомассу, исходя их объема двух основных геометрических фигур, шара для неуплощенных форм и эллипсоида для уплощенных. Удельный вес принимался равным 1. Тогда, биомасса таких видов, как *Plagiopyxis, Centropyxis, Trigonopyxis, Cryptodifflugia* будет равна:

$$\mathbf{B = 0.524D^3},$$

где D – диаметр раковины.

Для расчета биомассы уплощенных видов - большей части Arcellidae, Euglyphidae, Hyalospheniidae и других пользуются формулой:

$$\mathbf{B=4/3\ abc\pi N/10^9},$$

где a,b,c - радиусы эллипсоида, N - количество организмов. У этого способа есть недостаток - у плоских форм промер всех трех радиусов может быть затруднен чисто технически сложностями поворота и удержания раковинок на одном из ребер. Обычно сопровождающий расчеты промер 10 экземпляров нескольких видов и дальнейшая экстраполяция на другие виды, близкие по размерам (Schönborn, 1975), также неудовлетворителен из-за вариабельности размеров раковинок у разных видов, проявляющейся по-разному в конкретных типах микробитаний (Bobrov, Mazey, in press).

Другой способ основан на принятии среднего диаметра раковинных амеб в лесных почвах равным 50 мкм, у которых 2/3 объема раковинки занимает цитоплазма (Chardez, Delecour, 1970). Недостатки подобного подхода очевидны.

Корганова (1979) провела сравнительный анализ различных методов подсчета биомассы раковинных амеб и нашла, что у каждого метода есть свои недостатки и зависят они от размерной структуры населения конкретного биотопа, в котором могут преобладать или крупные раковинки, или, наоборот, мелкие. Вследствие этого могут быть получены как завышенные, так и заниженные результаты. Использование при вычислении множительных коэффициентов также может приводить к искажению результатов (Chardez, 1985).

Предлагаемый ниже подход также не может быть универсальным, но в основе его лежит попытка повышения точности расчетов.

1. Активные раковинки и раковиики с цистами объединяют в один класс раковинных амеб с живой цитоплазмой. Пустые раковинки подсчитывают отдельио. Дифференцированный подсчет раковинных амеб, предложеиный Куто (Couteaux, 1976) с разделеиием на живые, с цистами, с эпифрагмой (состояние предцисты) и пустые показывает, что такое деление нецелесообразно. В одной из проб Куто раковиики с цистами составили - 0,89%, с эпифрагмой - 1,67%, живые - 14,01%. Сумма этих трех групп – 16,57% и их можно объединить в группу амеб с живой цитоплазмой, так как доля раковииок с цистами была незиачительиой (меиее 1%). Проведеииый иами в одной из проб подобный подсчет дал сходные результаты, что подтверждает нецелесообразиость раздельного подсчета.
2. На следующем этапе проводится морфометрия каждой живой раковинки, включая раковинки с цистами. Измеряется диаметр клетки и диаметр цист. Для каждого вида в каждой пробе рассчитывается средний диаметр клетки, с учетом которого проводятся все дальнейшие расчеты. Такая подробная морфометрия связана с изменчивостью размеров раковииок амеб в зависимости от условий микрообитаиий. Удельиый вес вещества клетки прииимается за 1 мкг/мкм^3). Было решеио в качестве рабочей формулы пользоваться формулой объема шара с поправками для уплощеииых форм видов из таких родов, как *Corythion, Assulina*, некоторых видов из рода *Euglypha*.

Объем клетки в форме шара диаметром 50 мкм будет равен 65500 мкм^3, объем эллипсоида с осями 50, 70 и 15 мкм будет равеи 27510 мкм^3, этот объем будет равен объему шара с диаметром около 38 мкм. Для упрощеиия расчетов ось эллипсоида умножается иа коэффициеит 0.78 и в дальнейшем объем вычисляется по формуле шара.

ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ, БИОМАССЫ И ВИДОВОГО СОСТАВА ЭНХИТРЕИД

Метод Рёмбке (Römbke)

Необходимое оборудование и материалы.

1. Бур диаметром 5-6 см для отбора проб длиной 12 - 16 см

2. Пластиковая киянка для вдавливания бура в почву
3. Электронный термометр/гигрометр
4. Водопроводная вода
5. Пластиковые тазы диаметром 20 и высотой 10 см
6. Пластиковые сита диаметром примерно 15 см с ячеей 0.5 мм
7. Чашки Петри диаметром 12 см. Дно чашек делят на сектора для удобства подсчета
8. Небольшие стеклянные чашки или пластиковые чашки Петри для отбора энхитреид
9. Острый кухонный нож
10. Холодильник
11. Бинокуляр с увеличением до 40 х
12. Микроскоп с увеличением до 400 х
13. Изогнутые стоматологические скарификаторы или энтомологические булавки впаянные в стеклянную трубку.
14. Стеклянные пипетки с грушей
15. Спирт (70 %)
16. Бенгалроз (краситель).
17. Пластиковые или металлические ванночки для проявки фотоматериалов (только для предварительной оценки числа энхитреид в новом месте)
18. Пробирки Эппендорфа с крышечкой.
19. Аппарат для лиофилизации образцов.
20. Аналитические весы с точностью до 0,1 мг.

Процедура.

Отбор проб

1. Бур осторожно вдавливается в почву на глубину 12–16 см в зависимости от типа почвы. В редких случаях используют пластиковую киянку для вколачивания бура в почву.
2. После извлечения бура почву осторожно вынимают или выталкивают из бура
3. При отборе больших проб почвы для оценки численности и биомассы крупных почвенных беспозвоночных для оценки энхитреид от пробы по всей длине отделяют часть, составляющую примерно 5-ую часть пробы.

4. Образец разрезают ножом на субобразцы высотой 3-4 см. Эти субобразцы сохраняют до экстракции в пластиковых пакетах при температуре 4-6°C в течение не более недели.
5. Бур после извлечения образца промывают водой.

Экстракция энхитреид

Экстракцию следует проводить как можно скорее после отбора проб.

1. Каждый субобразец кладут на сито, которое опускают в пластиковый таз, так чтобы сито не касалось дна таза.
2. Образцы осторожно разрушают руками, и после этого таз заполняют водой, покрывая поверхность образца.
3. Для того чтобы экстрагировать более 90% энхитреид образцы почвы следует выдерживать 4-7 дней, а образцы подстилки 1-2 дня при температуре воды не более 12 ± 2°C. Продолжительность экстракции зависит в большей мере от содержания органического вещества. Время экстракции зависит и от преследуемых задач и необходимого числа энхитреид, если экстракция животных проводится для эксперимента. Следует помнить, что недостаток кислорода в воде ведет к быстрой гибели животных.
4. По окончании экстракции сита удаляют и почву выбрасывают.
5. Воду осторожно сливают, так чтобы над осадком осталось 5 - 10 мм воды. Оставшийся осадок на дне таза осторожно взмучивают, и суспензию переносят в чашки Петри или стеклянные чашки. Как только муть осядет, возможен отбор энхитреид скарификаторами или булавками или пипетками Эппендорфа. Предлагаемый автором метода отбор животных ювелирным пинцетом травмирует животных.
6. Животных переносят в маленькие сосуды или чашки Петри.

Замечание. Число экстрагируемых образцов ограничивается только числом сит и тазов и размерами комнаты для экстракции. Обычно одновременно можно экстрагировать до 50 образцов. Для этого удобно использовать прохладное подвальное помещение.

Определение энхинтреид

Определение энхитреид проводится по мере возможности сразу же после экстракции, так как животные гибнут в воде через несколько дней даже при

содержании в холодильнике. Жнвотных переносят под микроскоп на стекло в каплю слабогазированной минеральной воды для обездвиживания с помощью CO_2. Определение ведут по определителю Nielsen & Christensen (1959, 1961), который достаточно устарел. Одновременно в большннстве почв встречается примерно 3-25 видов.

Фиксация энхитреид

Определение энхитреид ведут на живом материале, так как при фиксацин в 70% спирте животные теряют некоторые морфологнческие прнзнаки. Можно окрашивать животных Бенгалроз, н заключать в препараты на стекле, но это процедура требует времени и детально не описана в лнтературе.

Для проб взятых в незнакомом месте в первый раз используют фиксацию почвы, заливая ее 96% спиртом и окрашивая через несколько минут 1% спиртовым раствором Бенгалроз. Для этого почвенный образец перед фнксацией распределяют тонким слоем на поверхности белой пластиковой или металлической ванночки. После суточного выдерживания проб животных легко выделить по ярко розовой окраске. Но такую процедуру используют обычно однократно.

Биомассу энхитреид можно определить, отбнрая особей разных групп в пробирки Эппендорфа и затем высушивая животных в течение суток лиофилизацией. Массу определяют на аналитических весах.

Метод О'Коннора

Другой метод экстракции в воронках, называемый методом О'Коннора (в разных модификациях) широко используется спецналнстамн по энхитрендам в разных модифнкациях.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Стеклянные или пластиковые воронки диаметром 9-10 см с диаметром носика около 1-1,5 см.
2. Пластиковые сита по диаметру несколько меньшие, чем диаметр воронки.
3. Прозрачные силиконовые трубки длиной 20-25 см по диаметру носика воронки.
4. Пластиковые или стеклянные пробирки по диаметру носика воронки.
5. Штативы для воронок.
6. Штативы для пробирок

7. Водопроводная вода.
8. Лампы 25-40 ватт.
9. Реостат.
10. Холодильник.

Процедура.

1. Трубку вставляют в носик воронки и с другого конца вставляют пробирку.
2. Установив вороику в штатив, в нее ставят пластиковое сито, на которое кладут почвеиный образец, распределяя его по площади сита до верхнего края воронки.
3. Образец полностью заливают холодной водопроводной водой, лучше выдержанной в холодильнике до температуры 5-7^{o}C.
4. Над образцом располагают лампу, включаемую через реостат примерио на четверть мощности, затем через полчаса мощность увеличивают до половины, затем еще через полчаса до 3/4 и наконец еще через полчаса до полной мощности. При полной мощности образец выдерживают 1 час.
5. После экстракции пробирку выиимают и до идеитификации червей хранят в штативе в холодильиике.

Для регулирования мощности ламп используют автоматические реостаты с постепенным увеличением мощности. Основная задача - медленное увеличение мощности для того, чтобы животные не погибли в пробе при резком увеличении температуры.

В другой модификации метода О'Коннора экстракция энхитреид ведется в пластиковые бутылки герметично соединенные с воронками.

1. Полулитровые пластиковые бутылки соединить герметично с воронками и заполиить охлажденной до температуры 5-7^{o}C водой до половины высоты воронки.
2. Положить пробы в сита (ячея 1 мм) и взвесить.
3. Опустить сита на воронки и довести уровень воды до половины высоты сит.
4. Поставить системы в эклектор, состоящий из ванны охладителя, в которую ставят бутыли и лампы 150 ватт в металлических абажурах сверху
5. Накрыть пробы сверху хлопчатобумажной тканью для усиления градиента.

6. Включить водоохладитель. Температурный датчик поместить поверх проб, избегая контактов с металлом, и накрыть хлопчатобумажной тканью.
7. Выгонять энхитреид согласно графику, приведенному на рисунке 5.
8. Убрать сита с пробами, обстучать воронки, чтобы черви соскользнули со стенок на дно и оставить на 1-2 минуты. Снять воронки. Через 1-2 минуты осторожно с поверхности откачать избыточную воду из бутылок (резиновой грушей или сифоном), так как черви скапливаются на дне бутылок.
9. Оставшуюся воду перелить в чашки Петри с разметкой на дне или с заборчиками. При необходимости дать взвеси осесть. Считать червей под бинокуляром.

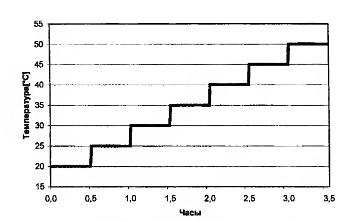


Рис. 5. Режим температуры при выгонке энхитреид

ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ, БИОМАССЫ И ГРУППОВОГО СОСТАВА НЕМАТОД

Необходимое оборудование и материалы.

1. Стеклянные или пластиковые воронки диаметром 5-7 см с диаметром носика около 0,5 см.
2. Куски пластикового сита с ячеей примерно 0,05 мм.
3. Прозрачные силиконовые трубки длиной 15 см по диаметру носика воронки.

4. Зажимы Мора.
5. Пластиковые одноразовые стаканчики объемом 50-100 мл
6. Штативы для воронок.
7. Лампы 12-15 ватт.
8. Водопроводная вода.
9. Холодильник.

<u>Процедура.</u>

1. Прозрачную силиконовую трубку надевают на носик воронки, пережимая свободный конец зажимом Мора.
2. Предварительно взвешенную пробу в капроновом сите опускают в воронку.
3. Воронку заливают охлажденной до 12^{O}С водой и оставляют на сутки при комнатной температуре или располагают над пробой лампу.
4. Спустя сутки (при использовании лампы - через 12 часов) нематоды собираются на пережатом конце. Отпустив зажим, нематод собирают в пластиковые одноразовые стаканчики объемом 50-100 мл.
5. Стаканчик покрывают пластиковой пищевой пленкой и оставляют в холодильнике до подсчета.

Нематод можно также экстрагировать модифицированными методами Кобба и Оостенбринка. Метод Кобба дает более точные результаты.

Подготовка: Положить в сита диаметром приблизительно 15-20 см и ячеей 1 мм два молочных фильтра.

Метод Оостенбринка

1. Пробу поместить в литровый лабораторный стакан (предпочтительнее полиэтиленовый) с известной массой и взвесить.
2. Цельные почвенные пробы осторожно разломить руками и залить приблизительно 400 мл водопроводной воды (дистиллированной водой пользоваться нельзя!). Для разрушения пробы нельзя использовать нож или другие острые предметы, так как это приводит к гибели значительной части нематод.
3. Оставить пробу размокать.

4. После размокания интенсивно, но осторожно перемешать суспензию стеклянной или деревянной палочкой в теченне 45 секунд. Дать суспензин отстояться в течение 15 секунд.
5. Верхнюю часть суспензин, в которой скапливаются нематоды слить через сито Кобба (рнс. 6) с ячеей 365 мкм в емкость объемом 1,5 – 2 лнтра. Следить за тем, чтобы основная масса почвы не попала в сборную емкость н жидкость не содержала слишком много взвесн и крупных органическнх частиц. Необходимо следить, чтобы попадающий на сито крупный органический материал ие нграл бы роль фильтра. Попавшие иа сито Кобба органические частицы н прочее смыть струей воды иа молочный фильтр в экстракционном сите, не собирая фильтрат.
6. Пункты 4 и 5 повторить еще 2 раза (всего процедура проводится 3 раза).
7. Фильтрат из сборной емкости пропустнть трнжды через снто Кобба 50 мкм. Каждый раз отфильтрованиый материал откидывать иа молочный фильтр. Надо стараться смыть с сита максимальное колнчество осадка.
8. Экстракционное сито поставить в тарелку подходящего диаметра н аккуратно наполнить последнюю свежей водой, покрыв водой фильтр.
9. Оставить сита на 44 часа для проникания иематод через фильтр в тарелку.
10. После экстракции осторожио удалить сито с фильтром. Жидкость в тарелке отфильтровать сквозь вороику с надетым фильтром нз 20 мкм мельничного газа. Отфильтрованных нематод смыть в счетную чашку Петри с размеченным дном н пересчитать под бинокуляром с увеличением 16х. Для определення нематод до рода их фиксируют согласио процедуре, описанной ниже.

Метод Кобба

1. См. пп. 1-4 метода Оостенбринка
2. Слить верхнюю часть жидкости в сборную емкость.
3. Повторить п. 4 метода Оостенбринка еще два раза, добавляя каждый раз по 400 мл воды.
4. Собранную суспензию профильтровать через каскад сит Кобба с ячеей 1000, 400, 200, 100 н 50 мкм, начиная с самого крупного сита. Каждое из сит после фильтрации промыть струей воды над новой сборной емкостью (Рис. 6).
5. Фильтрацию через последнее и самое тонкое сито провести 5 раз.

6. Собранный фильтрат медленно вылить на сито с двумя молочными фильтрами (например, фильтры Hygia milac SW (Hartmann)), которое затем поместить в тарелку подходящего диаметра и залить водопроводной водой, так чтобы она покрыла фильтр.
7. Оставить пробы на 44 часа в темноте, для того чтобы нематоды проникли сквозь фильтры в тарелку.
8. Далее согласно п. 10 метода Оостенбринка.

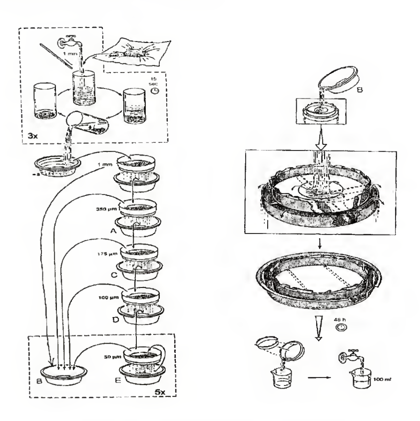


Рис. 6. Схема экстракции нематод методом Кобба.

Фиксация нематод

1. Вставить воронки в пробирки. Стык уплотнить парафином или резиновым переходником. После подсчета нематод, залить воду из счетных чашек Петри в воронки и дать отстояться в течение 2 часов для оседания нематод на дне пробирок.
2. Осторожно отсосать с поверхности излишнюю воду, таким образом, чтобы в пробирке осталось 1,5 мл жидкости.
3. Поставить пробирку на водяную баню с температурой воды 63°C. Выключить нагрев и дать пробе постоять на бане 2 минуты.
4. Добавить 1,5 мл 8% раствора формальдегида (т.о., его концентрация в фиксирующей жидкости становится 4%). Хранить зафиксированные пробы при температуре 4°C.

Нематод также можно зафиксировать горячим 70% спиртом с 5-10% глицерина. Определение биомассы нематод проводят тем же методом, что и энхитреид.

ЭВАКУАЦИЯ СОДЕРЖИМОГО ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА У КРУПНЫХ ПОЧВЕННЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ БИОМАССЫ

Животных содержат на влажном субстрате в течение 2-3 суток для дефекации.

Метод сатурированной фильтровальной бумаги

Необходимое оборудование и материалы.

1. Фильтровальная бумага
2. Водопроводная вода
3. чашки Петри

Процедура.

1. В чашки Петри закладывается фильтровальная бумага.
2. Бумага пропитывается водой до полного насыщения. Избыток воды удаляется.
3. Животные помещаются в чашки Петри. Дождевых червей перед посадкой споласкивают в воде.
4. Выдерживают животных в течение 2-3 дней при температуре 16-20°C

Замечание. Далби (Dalby et al., 1996) указывает, что трехдневной выдержки достаточно для полного освобождения кишечника дождевых червей.

Эвакуация содержимого желудка дождевых червей с помощью агар-агара[6]

Необходимое оборудование и материалы.

1.Агар-агар
2. Водопроводная вода
3. Чашки Петри или пластиковые одноразовые стаканы
4. Пищевая пленка
5. Коническая колба или стакан на 250-500 мл
6. Плитка или микроволновая печь

Процедура.

1. Отвесить 2 г агар-агара и залить 200 мл воды.
2. Поставнть в микроволновую печь на среднюю мощность на 2 мин
3. Расплавленный агар залить в чашки Петри или пластиковые стаканы
4. После отвердения агара проделать отверстия ножом или иглой
5. Посадить червей
6. Выдержать при температуре 20°С в течение 4 суток

Замечание. Оптимальной средой является 1% агар. Меньшая концентрация ведет иногда к гибели животных. На 4 сутки копролиты червей практически полностью состоят из агара. На 1% агаре можно выдерживать и других животных для эвакуации содержимого кишечника. При этом агар не протыкают иглой или ножом. Буше предложил выталкивать содержимое пищеварительного тракта дождевых червей оплавленной леской. Однако это нелегко делать даже на червях экстрагированных из почвы формалиновым методом.

ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ, БИОМАССЫ И ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОАРТРОПОД

Выгонка мнкроартропод с помощью модифицированного эклектора Макфедьена (пробы диаметром 5 см). Создаваемый нагревателем градиент температуры и влажности в пробах заставляет животных передвигаться в нижние слои пробы и проваливаться в воронки с сосудами с фиксирующими жидкостями

[6] по: Pokarzhevskii et al., 2000

Необходимое оборудование и материалы.

7. Сита диаметром 6-7 см и высотой 5 см с ячеей 2 мм.
8. Кружочки из капроновой сетки с ячеей 2 мм по диаметру сит.
9. Конусообразные контейнеры (пластиковые стаканы) с внутренним диаметром в диаметр сит.
9. Крышки для контейнеров
10. Хлопчатобумажные платки
11. Эклектор с автоматической регуляцией температуры.
12. Водоустойчивый маркер.
13. Этиленгликоль
14. Жидкое моющее средство
15. Груша или сифон с фильтром из мельничного газа для отсасывания фиксатора из контейнера
16. Этанол 96%

Процедура.

1. Пронумерованные пластиковые контейнеры организовать согласно нумерации проб и заполнить на 0,7-1 см этиленгликолем с добавлением жидкого моющего средства.
2. Почвенные пробы взвесить и положить в сита, предварительно проложив дополнительный слой сетки с ячеей 2 мм для предотвращения попадания частиц почвы в этиленгликоль (особенно важно для минеральных проб).
3. Сита поставить на стаканчики и поместить их в эклектор.
4. Сверху всю поверхность проб и промежутки между ними накрыть хлопчатобумажной тканью для получения более эффективного градиента.
5. Включить водяной охладитель. Положить температурный датчик поверх проб, избегая его контакта с металлом и накрыть тканью.
6. Выгонку осуществлять согласно температурному графику (рис. 7). После выгонки извлечь микроартропод из сосудов, отсасывая этиленгликоль грушей с наконечником, закрытым 20 мкм мельничным газом и промыв осадок 96% спиртом.
7. Почву высушить при температуре 105°С в течение суток и взвесить для определения влажности по разности веса пробы до экстракции и после сушки.

Другой метод экстракции орибатид, используемый Д.А.Криволуцким, заключается в трехдневной экстракции клещей в воронках Туллгрена размером 15 х 15 см или диаметром 15 см под лампами 25-40 ватт в пробирки со спиртом.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Воронки круглые или квадратные.
2. Штатив для воронок
2. Сита высотой 5 см и размером дна в размер воронки, покрытым сеткой с ячеей 1-2 мм
3. Лампы 25-40 ватт в абажурах в диаметр воронки
4. Пластиковые или стеклянные (пенициллиновые) пузырьки с диаметром горлышка большим, чем диаметр носика воронки.
5. Этанол 96%

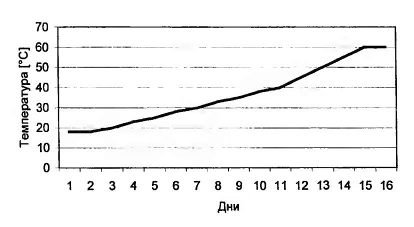


Рис. 7. Температурный режим выгонки микроартропод

Процедура.

1. Пузырьки наполняются спиртом и ставятся под воронки так, чтобы носик воронки был внутри пузырька, но не касался спирта.
2. Пробы распределяются по поверхности сита равномерно и сита ставят на воронки

3. Включают лампы расположенные над поверхностью пробы на расстоянии 15 см.

4. Через 3 дня экстракцию прекращают, выключив лампы и вынув пузырьки. В каждый пузырек вкладывают этикетку, написанную только простым карандашом. В пузырьки добавляют спирт и закрывают пробкой. Почву выбрасывают.

Замечание. Объем проб для оценки видового состава составляет от 5 x 5 x 5 см до 15 x 10 x 5 см. Большие пробы используются для учета динамики доминирующих видов (или вида клещей). Особи всех остальных видов учитываются вместе. Для учета общего видового состава предпочтительнее отбирать пробы прикомлевого мха объемом около 2 л, в котором обнаруживаются почти все виды, обитающие в данной местности

ЭКСТРАКЦИЯ ЖИВОТНЫХ ИЗ ИНТАКТНЫХ ПОЧВЕННЫХ ПРОБ В ЛАБОРАТОРИИ

При оценке макрофауны используют ручную разборку проб, но предложены и автоматические методы экстракции, подобно указанному выше для экстракции микроартропод.

Экстракция макрофауны (из проб диаметром 20 см)

Необходимое оборудование и материалы.

1. Сита диаметром 20 см и высотой 5 см с ячеей 5 мм.
2. Конусообразные контейнеры (пластиковые кюветы) с внутренним диаметром в диаметр сит.
4. Крышки для контейнеров
5. Хлопчатобумажные платки
6. Эклектор с автоматической регуляцией температуры
7. Водоустойчивый маркер
8. Этиленгликоль
9. Жидкое моющее средство
10. Этанол 70%

Процедура.

1. Пронумерованные пластиковые кюветы заполнить этиленгликолем (примерно 2 см по высоте) и добавить несколько капель жидкого моющего средства.

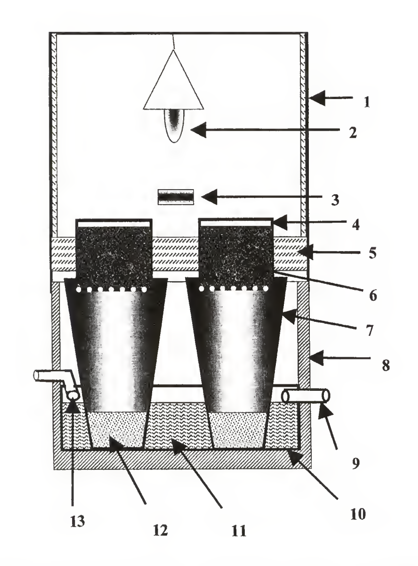


Рис. 9. Эстрактор Кемпсона. 1- верхняя часть кожуха, 2 – нагреватель (инфракрасная лампа), 3 – термодатчик, 4 – пластиковая труба с сетчатым дном, 5 – теплоизоляция, 6 – проба, 7 – пластиковый стакан, 8 – нижний кожух, 9 – выпускная труба охладителя, 10 – кювета охладителя, 11 – вода, 12 – фиксатор, 13 – впускная труба охладителя

2. Поместить почвенные пробы в сита с диаметром ячеи 5 мм в перевернутом положении, чтобы облегчить животным выход из пробы и взвесить. Длинные почвенные пробы положить горизонтально и разрезать надвое, промаркировав части. Компактные блоки подстилки из листьев широколиственных пород деревьев класть на бок. Пробы из минеральных горизонтов разломить. При экстракции уже раздробленных и частично гомогенизированных проб сита заполнять до половины. Вставить сито в кювету.

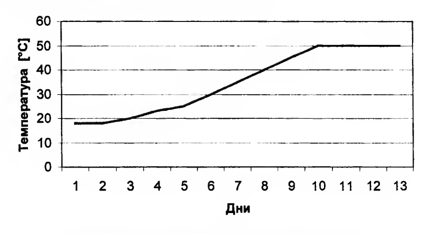


Рис. 8. Температурный режим экстракции макроартропод

3. Поставить сито с кюветой в эклектор (Система Кемпсона).
4. Сверху всю поверхность проб и промежутки между ними накрыть хлопчатобумажной тканью для получения более эффективного градиента.
5. Включить водяной охладитель. Положить температурный датчик поверх проб, избегая его контакта с металлом и накрыть тканью.
6. Выгонку осуществлять согласно температурному режиму (рис. 8).
7. После окончания выгонки собрать выгнанных животных из этиленгликоля, отмыть и зафиксировать в 70% спирте.

Сита с пробами можно вставить в теплоизоляцию эклектора между нагревателем и охладителем (вода с температурой 5-10°C), а вместо кювет использовать пластиковые пол-литровые стаканы, наполненные фиксатором примерно до уровня воды в охладителе (рис. 9). Диаметр сит при этом должен

быть 9 см (в диаметр стакана). При отборе также используется бур диаметром 9 см. Этим методом хорошо выгоняются диплоподы, губоногие многоножки, личинки жуков, подстилочные дождевые черви, небольшие членистоногие.

Ван Страален и Райнинкс (Van Straalen, Rijninks, 1982) предложили эклектор, позволяющий экстрагировать из одной пробы и крупных почвенных беспозвоночных, и микроартропод (рис. 10). Основной конструктивный элемент эклектора - контейнер для пробы. Он имеет полукруглые отверстия в боковой стенке на границе со съемным сетчатым дном, что позволяет крупным почвенным животным также попадать в воронку, тогда как мелкие животные, такие как коллемболы и клещи проваливаются сквозь сетку с ячеей около 1 мм. Эклектор помещают в термошкаф с нагревателями в верхней части и баком для проточной воды с охладителем в нижней. Нижняя часть отделена от верхней термоизоляцией, служащей штативом для контейнеров. Воронки закрепляются в штативе. Температура в верхней части над контейнером постоянно поддерживается на уровне 30^{o}C, в нижней части в районе приемного контейнера – 5^{o}C. Время экстракции обычно 10 дней. По мнению Д.А.Криволуцкого, в эклекторе не создается достаточного градиента влажности, так как приемный контейнер наглухо прикрепляется к воронке во время экстракции. В результате нижняя часть пробы остается долгое время влажной, и животные не полностью экстрагируются из пробы даже за 10 дней. Как выход из положения было предложено использовать открытые пластиковые стаканы объемом 300 мл, чтобы избежать потерь таких животных как дождевые черви.

ФОРМАЛИНОВЫЙ МЕТОД УЧЕТА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ В ПОЛЕ[7]

Необходимое оборудование и материалы.

1. Лопата
2. Пробник 20 x 20 см или диаметром 20 см и высотой 5 см
3. канистры на 10 л
4. 40% формалин
5. Вода

---

[7] по Raw, 1959

Процедура.

1. Пробник осторожно вдавливают в почву на 1 см.
2. Удаляется вся подстилка.

Проба трижды заливается по 1 л 0,55% водного раствора формалина. Промежутки между проливками составляют 10 минут. Вылезающих червей собирают и фиксируют в 70% спирте. Для получения 0,55% раствора формалина берут 150 мл 40% раствора и доводят объем водой до 10 л.

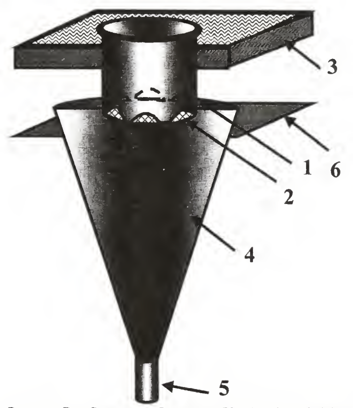


Рис. 10. Эклектор Ван Страалена и Райнинкса (Van Straalen, Rijninks, 1982). 1 – контейнер для пробы со съемным сетчатым дном; 2 – отверстия для крупных почвенных животных в стенках контейнера; 3 – теплоизоляция; 4 – воронка из нержавеющей стали; 5 – приемный контейнер; 6 - держатель для воронок

УЧЕТ ДИНАМИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОЧВЕННЫМИ ЛОВУШКАМИ БАРБЕРА

Поверхностно активные животные отлавливаются с помощью стаканов, вкопанных вровень с поверхностью почвы. Они фиксируются и сохраняются в фиксирующей жидкости. Содержимое ловушек сортируется в лаборатории и используется для расчета динамической плотности.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Пластиковые стаканы емкостью 0,5 л (верхний диаметр 9 см, глубина 15 см)
2. Крышки для ловушек. Наиболее практичны крышки, изготовленные из 1-мм прозрачного оргстекла (квадрат со стороной 15 см) на проволочных ножках, т.к. они не затеняют ловушки и слабо влияют на уловистость. Расстояние между крышкой и поверхностью почвы должно составлять 2-3 см.
3. Совок и/или небольшой почвенный бур
4. Пластиковые контейнеры или полиэтиленовые пакеты для транспортировки содержимого ловушек
5. Маркер
6. Этикетки (с указанием места и даты сбора, номера ловушки, фамилии коллектора) лучше заготовить заранее (написанные карандашом, тушью или распечатанные на лазерном принтере на плотной бумаге) или написанные в поле
7. Сетка для фильтрования содержимого стаканов
8. Пластиковые бутылки или канистры для приготовления и транспортировки фиксирующей жидкости
9. Пинцет
10. Раствор формалина (4%) или пропиленгликоля (10%) с несколькими каплями детергента для уменьшения поверхностного натяжения жидкости в ловушках
11. Этилацетат для замаривания живых беспозвоночных в стаканах
12. Спирт (70%) для фиксации материала.

Процедура.

1. Участок, на котором располагаются ловушки, должен наиболее полно охватывать разнообразие местообитаний.

2. На каждом участке размещают по 10 ловушек, расположенных в линию.
3. Экспозиция ловушек обычно начинается с началом активности почвенных животных и продолжается до первых заморозков (апрель – октябрь в Средней полосе).
4. Выемка материала проводится 1 раз в 14 дней.
5. Для проведения мониторинговых исследований минимальный срок экспознции – две недели.
6. Жуков отсортировывают по группам, промывают, раскладывают на ватные матрасы и просушивают в термошкафу при 40°С.
7. Беспозвоночных с мягкими покровами фнксируют в спирте или формалнне.

Расчет динамической плотности. Динамическая плотность выражается в сумме животных, пойманных за определенный пернод на ловушку или участок (группу ловушек). Такие данные позволяют проводить сравнение между участками и/или при повреждении ловушек во время экспозицнн. Не для всех герпетобиотнтных групп метод является адекватным для расчета динамической плотности, в частности, он неприменим для перепончатокрылых.

Замечания. Фнксирующая жидкость, нспользуемая наиболее часто, - формалин, хороша тем, что она слабо испаряется и хорошо сохраняет животных, даже разведенная дождевой водой. Однако формалин сильно загрубляет насекомых н имеет неприятный запах, а в больших количествах ядовит. Пропнленгликоль более приятен в работе, однако для отмывания от него насекомых требуется большее количество времени. Немаловажным является и его большая стоимость. В некоторых случаях в качестве фиксатора используется уксусная кислота (10%). Следует помнить, что каждая из этих жидкостей имеет различное прнвлекающее воздействне на разные группы насекомых н стараться по крайней мере в условиях одного полевого экспернмента нспользовать одну жидкость.

Фиксирующую жидкость следует использовать только один раз во нзбежанне изменения ее аттрактивности для насекомым.

Удобно использовать два стакана в ловушке: один в качестве каркаса лунки, а второй собственно как ловушку. При этом необходнмо, чтобы отсутствовал промежуток между краем стакана и почвой. Многие нсследователи пользуются пластиковыми стаканами с крышками, закрывая стакан крышкой при сборе

материала и заменяя его на новый. Устанавливая ловушки, следует предохранять их от попадания материала (ветки, листья), понижающего эффективность

Взрослые насекомые составляют непропорционально большую долю сборов с помощью ловушек Барбера, считается (Meyer, 1996), что ювенильные особи менее активны. Грюнталь (1981) указывает, что большое количество фиксатора в ловушках изменяет соотношение в пользу гигрофильных видов.

УЧЕТ ТРОФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ПРИМАНОЧНОЙ ПЛАСТИНКИ[8]

Пищевую активиость определяют по количеству перфорированных приманок в приманочной пластиике (bait-lamina test) после экспонирования ее в почве.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Стандартные пластинки из твердого пластика длиной 12-16 см, шириной 0,5 см и толщиной 1,5 мм с 16 отверстиями диаметром 2 мм, расположенными на расстоянии 5 мм между центрами (рис. 10)
2. Узкий нож для погружения пластинок в почву
3. Расчерченный на число строк, равиое числу пластиiок, и 16 столбцов лист для записи результатов экспонирования пластинок в поле
4. Карандаш
5. Красная ткань или колышек для маркировки места установки пластинок
6. Микрокристаллическая целлюлоза
7. Порошок листьев крапивы (можно покупать в аптеке как чай)

Процедура.

1. Отверстия в пластинках предварительио заполняют приманкой - влажной смесью порошка листьев крапивы и микрокристаллической целлюлозы в соотношении 3:7, которую подсушивают в полосках в течение 2-х суток при комнатной температуре.
2. На выбранном участке располагают по 16 пластинок, втыкая их в почву так, чтобы верхний край верхнего отверстия находился непосредственно под поверхностью почвы.

---

[8] по von Törne, 1990 a, b

3. Предварительно одну полоску втыкают в почву и сразу вынимают, чтобы проверить, есть ли механические повреждения приманки. При наличии механических повреждений пластинки заполняют приманкой заново.

4. Полоски располагают лентой на расстоянии 10 см.

5. Перфорирование приманок оценивают на 10 или 14 сутки.

6. Результат выражается в доле перфорированных приманок (количество отверстий, отнесенное к общему количеству приманок)

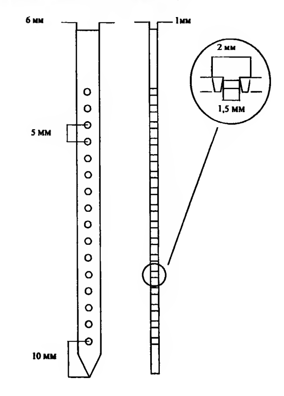


Рис. 11. Приманочная пластинка (по Kratz, 1998)

Замечания. Использование в виде приманки различных субстратов (смесь агара, целлюлозы, овсяных хлопьев и активированного угля) должно применяться повсеместно в пределах одного эксперимента

В оригинальной методике предлагается использовать по 16 пластинок на участок, но в зависимости от задач исследования и размеров участка можно использовать от 8 до 48 пластинок. Минимальное число пластинок используется иногда в биоиндикационных исследованиях. Максимальное число - для оценки пространственного распределения пищевой активности или временной динамики активности.

При просмотре приманок необходимо аккуратно очистить их от почвы и на просвет определить форму отверстия. Искусственное повреждение приманки, вызванное пересыханием субстрата и повреждениями во время работы не должны считаться перфорированием.

Преимуществом метода является его простота и быстрота получения результатов. Однако они сильно зависят от влажности и температуры почвы. В зависимости от природных условий, доля перфорированных приманок может составлять от 10 до 65% за 14 дней экспозиции.

Сравнение данных с помощью метода приманочных пластинок проводят с помощью Mann-Witney U теста или метода сравнения медиан. Статистический пакет Statgraphics for Windows включает данную процедуру сравнения.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Морфологические размеры и флуктуирующая асимметрия, измеряемые на индивидуальном уровне, характеризуют состояние популяции (Захаров, 1987).

Необходимое оборудование и материалы.

1. Бинокулярный микроскоп
2. Окуляр с мерной линейкой
3. Выборка по 100 самцов и 100 самок с участка
4. Энтомологические булавки для накалывания насекомых
5. Журнал для записей результатов измерений

Изучают морфометрические параметры насекомых, длину голеней, бедер, первого членика усиков, длину и ширину надкрылий у жуков. У видов с

выраженной гетеродинамностью покровов изучают различия в орнаменте или микроскульптуре левой и правой сторон. Например, у жужелиц *Pterostichus oblongopunctatus* подсчитывают количество ямок на левом и правом надкрыльях и жуков относят к той или иной морфе: с 3-мя; с 4-мя; с 5-ю ямками на надкрылье и т.д. Для каждой половой выборки определяют среднее число морф (μ) и долю редких морф (h) по формулам Животовского (1982):

$$\mu = (\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + ... + \sqrt{p_m})^2, \text{ ошибка: } S_\mu \approx \sqrt{\frac{\mu(m-\mu)}{N}};$$

$$h = 1 - \mu/m, \text{ ошибка: } S_h \approx \sqrt{\frac{h(1-h)}{N}},$$

где m – число морф в выборке, $p_1, p_2, ... p_m$ - выборочные значения частот морф ($p_1 + p_2 + ... + p_m = 1$); N – число имаго в выборке.

Для каждой выборки определяют коэффициент квадратичного отклонения (k) при сравнении левого и правого надкрылий по формуле:

$$k = \sqrt{\frac{\sum\left(x_{\text{прав}} - x_{\text{лев}}\right)^2}{n}},$$

где $x_{\text{лев}}$количество точек на левом надкрылье, $x_{\text{прав}}$ - то же на правом, n - количество особей в выборке.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ХРОМОСОМ И СПЕРМАТОЗОИДОВ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ ДЛЯ КАРИОЛОГИЧЕСКОГО И МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Получение воздушно-сухих препаратов сперматозоидов, а также метафазных митотических и мейотических пластинок сперматогониев и сперматоцитов 1-го порядка у дождевых червей.

Необходимое оборудование и материалы.

1. Лабораторная центрифуга
2. Центрифужные пробирки (объем 5 мл)
3. Глазные пинцеты, глазные ножницы и скальпель
4. Пипетки дозаторы на 3 мл
5. Предметные стекла

6. 0,1% раствор колхицина
7. Фиксатор (C_2H_5OH и $C_2H_4O_2$ в соотношеиии 3:1)
8. Изотонический 0,56 % раствор KCl.

<u>Процедура.</u>

1. За 10-12 часов до вивисекции в дождевого червя внутрицеломно вводят 0,5 – 1 мл 0,1% раствора колхицина. Иглу шприца следует вводить под острым углом к телу дождевого червя иа 1-2 мм. Дождевые черви с этого момента содержатся при комнатной температуре в чашках Петри на влажной фильтровальиой бумаге.
2. Для изготовлеиия клеточиой суспеизии используются ткани семенников. С этой целью вырезают 8-16 сегменты дождевого червя и помещают их в чашки Петри. Кутикулу разрезают с дорсальиой стороны.
3. С помощью глазиых пинцета и скальпеля отделяют ткани пищеварительного тракта. Затем глазным скальпелем осуществляется соскоб с внутренней стороны вскрытых сегментов. Соскоб тщательно измельчают глазными ножницами в изотоническом 0,56 % растворе KCl.
4. По истечении часа суспензию с помощью дозатора переносят в центрифужную пробирку
5. В пробирке с помощью пипетки суспеизию тщательно гомогеиизируют в течение нескольких минут. При необходимости объем суспензии доводят до объема 2 мл, добавляя изотоническй 0,56 % раствор KCl.
6. Клетки из приготовленной суспензии осаждают центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об./мин.
7. Надосадочную жидкость сливают, и в пробирку заливают свежий раствор фиксатора. Осадок виовь ресуспендируют и помещают на 30 минут в холодильник (t=5°C).
8. По истечеиии 30 мии объем жидкости виовь доводят до объема 2 мл и клетки осаждают центрифугированием. Подобную процедуру повторяют трижды.
9. После третьего центрифугирования и ресуспендирования клеточная суспензия наносится на чистые, абсолютно сухие предметные стекла и подсушивают при комнатной температуре

10.После высушивания препараты хранят в теченне двух суток в закрытых коробках прн комнатной температуре.

11.Окраска препаратов может производиться различнымн гнстологнческими и цитогенетическими красителямн в зависимостн от задач поставленных перед исследованнем.

Замечания. При введении раствора колхицина в особей нз мелких подстилочных видов игла шпрнца может попасть в глотку и клеточный яд не достигнет семенников. Поэтому следует нспользовать самые тонкие иглы.

КАРТОГРАФИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ ПО БИОРАЗНООБРАЗИЮ ПОЧВЕННОЙ БИОТЫ

Поскольку проблему картировання показателей структуры, бноразнообразня н функционирования почвенной биоты трудно описывать без конкретного примера остановимся на исследованни А. С. Зайцева нз его диссертацнонной работы (2002).

Выбор и оценка полноты материалов для базы данных

Необходимое оборудование и материалы.

1. Персональный компьютер не ниже Pentium II - 300 и объемом памяти не менее 64 Мгб со сканером н принтером н моннтором с разрешеннем 1024х768 пиксел
2. Программный пакет Mapinfo Pro 5.0 и выше - полная установка
3. Программный пакет MS Office 97 и выше
4. Статистический пакет (напрнмер, Statistica 5.0 и выше).

В базу данных былн помещены практически все нзвестные опубликованные и собственные неопубликованные материалы о фауне и населеннн орнбатид Европейской России (ЕТР). Главным критерием выбора точек была их изученность н репрезентативность. Обследование зональных ненарушенных биотопов имели приоритет. Материал, полученный из антропогенно измененных местообитаний, использовался как дополнительный для формирования фаунистических списков. Собственные сборы автора были спланированы так, чтобы по возможности обследовать наиболее крупные «белые пятна» на территорнн ЕТР. Особенно это относится к Архангельской и Тульской областям.

Фауна городов изучалась в основном с целью установить возможность проникновения экзотических видов в городские ландшафты, за счет которых региональное разнообразие панцирных клещей может существенно возрастать.

База данных

В процессе подготовки работы была создана пространственная компьютерная база данных распространения панцирных клещей Европейской части России с использованием программного пакета Mapinfo. Она является в корне переработанным и значительно расширенным по возможностям вариантом базы данных, использованной ранее для обработки данных о панцирных клещах Европейского Севера России (Криволуцкий и др., 1999). В ней содержатся сведения о распространении всех отмеченных видов панцирных клещей, приведенных в каталоге, а также их семейств. Она позволяет по имеющимся в ней данным строить карты распространения на ЕТР семейств и отдельных видов орибатид. Заложены в базе и возможности анализа распределения различных характеристик сообществ по территории. Расчет таких характеристик идет автоматически.

База данных состоит из трех блоков:

1. блок ввода и хранения данных
2. картографический ГИС-блок
3. аналитический ГИС-блок.

Более подробно структура БД и наполнение ее материалом в настоящее время представлены на рис. 12.

Еще одним преимуществом предлагаемой структуры является функциональное разделение блоков ввода и хранения информации и картографического блока. Теперь даже пользователь, не имеющий специальной подготовки в работе с геоинформационными программными пакетами, может вносить необходимые изменения на карту, работая в своей излюбленной программе электронных таблиц. Автоматическая связь с картографическим ядром позволит ему получать обновленные карты без дополнительных усилий. С ее помощью может быть создан широкий спектр тематических карт, на которых в качестве картографической основы используются сетка административного деления ЕТР,

карта растительных и почвенных зон, а также любые другие доступные карты основы, оцифрованные самостоятельно.

Эта разработка была апробирована и на других территориях. Совместно с др. М. Бергом (Свободный университет, Амстердам, Нидерланды) был составлен компьютерный атлас распространения видов панцирных клещей Нидерландов. Заложенные в структуре базы данных алгоритмы и аналитический аппарат позволили получить провести анализ распределения разнообразия орибатид на территории этой страны (Zaitsev, Berg, 2001).

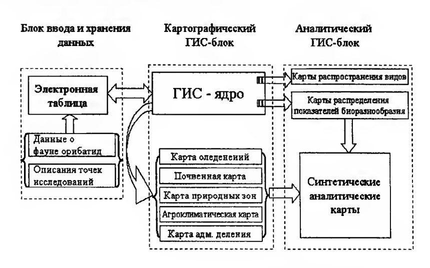


Рис. 12. Структура пространственной базы данных.

Модель для оценки разнообразия почвенной фауны на примере панцирных клещей. От локального уровня к региональному

В основу предлагаемой модели легли классические представления Аррениуса о зависимости числа видов от площади (Arrhenius, 1921).

На первом этапе проводится оценка величин видового разнообразия для тех выделов, в пределах которых проводились фаунистические исследования орибатид.

При анализе фаунистических списков разных природных зон и административных единиц на равнинной части Европейской России было установлено, что список видов для всего спектра местообитаний отобранных в одном месте является исчерпывающим в пределах всего выдела. При этом сами районы должны располагаться таким образом, чтобы охватить все ландшафтное разнообразие природных местообитаний территории. Степень изученности фауны выдела может быть оценена по балльной шкале, как доля обследованных типов местообитаний на уровне фации к их общему числу.

В предлагаемой методике делается допущение, что все ландшафтное разнообразие природной зоны в пределах ЕТР будет исчерпано наиболее представительными типами местообитаний. Своеобразными «горячими точками» или очагами дополнительного разнообразия для каждой природной зоны будут биотопы, представленные в табл. 6.

Таблица 6. Градации степени изученности фауны орибатид

Степень изученности	Баллы
Неизученные	0
Фрагментарно изученные	1-4
Недостаточно изученные	5-8
Достаточно изученные	9-12

Предложенная ранее модель оценки видового разнообразия орибатид крупных природных территорий давала заниженные значения разнообразия. Это происходило из-за того, что она как раз не учитывала ландшафтное разнообразие, т.е. закономерности распределения бета-разнообразия сообществ орибатид. Необходима в дальнейшем выработка поправочных коэффициентов для каждой природной зоны или типа почв, которые бы учитывали присутствие в пределах данного выдела интра - и экстразональных местообитаний.

Суть этой методики заключается в следующем. Опираясь на какой-либо выдел с хорошо изученной фауной, оценивается приращенне числа видов в фаунистическом списке при добавлении очередного района исследований. Такой наиболее изученной территорией, по нашему мнению, является тайга Европейской части России. Число известных видов для этого выдела на настоящий момент максимально (390) и рассчитано по 12-и местам отбора проб. В естественных местообитаниях новых видов, согласно сборам авторов, здесь

практически не встречается. Основываясь на собственном опыте и литературных данных (Криволуцкий и др., 1982), число видов в одном районе фаунистических исследований для этой зоны равно 80 - 100. Таким образом, можно предположить, что каждый последующий сбор дает приблизительно 30 "новых" видов, т.е. примерно 8% от общего числа видов. Потенциальное видовое разнообразие каждого выдела может быть описано эмпирической формулой:

$$\mathbf{Ps = So(1+1{,}2/n+10/So), \quad (0<n<12)}$$

где Ps – ожидаемое видовое разнообразие, So - число видов известных для данного выдела, а n - число районов в пределах данного выдела, в которых были проведены исчерпывающие фаунистические исследования.

Член «1,2/n» описывает количество не найденных, но обитающих в данном выделе видов. «10/So» введен в формулу для учета значения космополитных видов, которые могут и не быть найдены в определенном месте, но чей ареал охватывает всю территорию ЕТР. По нашим оценкам, таких видов около десяти (например, это *Tectocepheus velatus, Oppia neerlandica, Oribatella calcarata*). Чем выше степень изученности территории, тем меньше вероятность, что эти виды не будут встречены. Эмпирические коэффициенты в формуле подобраны для площади 10000 – 100000 квадратных километров.

Очевидно, что эмпирические коэффициенты будут зависеть от размеров выдела, широты охватываемого ими спектра ландшафтов и группы почвенной фауны. Настоящая формула применима для карт, где в качестве базовых выделов берется сетка административного деления на уровне субъектов федерации, природные зоны с подзонами (для тайги) или размещение типов почв. Эмпирические коэффициенты и вид самой функции возможно предсказать из графиков кумулятивного распределения числа видов по районам фаунистических исследований. Лучше всего это можно показать на фауне средней тайги или подзолистых почв (табл. 7).

Безусловно, предлагаемая методика расчета имеет ряд ограничений. Наиболее адекватно формула работает для биогеографически и фаунистически однородных выделов. Она не учитывает возможное существование в пределах известного выдела локализованных реликтовых сообществ. Также формула плохо работает для описания сообществ панцирных клещей горных территорий, где необходимо

учитывать разнообразие биотопов в колонке высотной поясности. В горах зависимость потенциального числа видов от числа известных видов и степени обследованности территории будет еще более сложной.

Таблица 7. Максимально представительный набор прочих биотопов с точки зрения изучения биоразнообразия панцирных клещей по природным зонам (по: Мильков, 1977; Давыдова и др., 1989).

№	Природная зона	Список прочих биотопов в пределах зоны
1	Арктические пустыни	Долины ледниковых водотоков, склоны южной экспозиции, морские берега
2	Тундра	Арктические тундры, типичные тундры, красочные тундры, долины рек
3	Лесотундра	Лесотундра, долины рек, верховые болота, антропогенные ландшафты
4	Тайга (все три подзоны)	Еловые леса, сосновые леса, долины рек, верховые болота, низинные болота, пихтовые леса, луга, антропогенные ландшафты
5	Смешанные леса	Участки еловых и широколиственных лесов, сосновые леса, долины рек, верховые болота, низинные болота, луга, антропогенные ландшафты,
6	Широколиственные леса	Участки степей, сосновые леса, долины рек, верховые болота, низинные болота, суходольные и низинные луга, антропогенные ландшафты
7	Лесостепь	Участки типичных и красочных степей, леса, низинные болота, балки, долины рек, антропогенные ландшафты
8	Степь	дюны, байрачные леса, долинные луга, антропогенные ландшафты, засоленные участки
9	Полупустыни	степные участки, пустыни, дюны, солончаки, солонцы, заросли кустарников, антропогенные ландшафты
10	Пустыни	долинные леса, солонцы, солончаки, каменистые россыпи

На втором этапе проводится прогноз биоразнообразия для тех территорий, на которых исследований фауны не было вообще.

Расчет ожидаемых величин видового разнообразия выполняют по формуле:

$$D = \sum_i d_i \frac{L_i}{L}$$

где D - видовое разнообразие в данном выделе; di - видовое разнообразие в i-м соседнем выделе; L - периметр исследуемого выдела и Li - протяженность общей

границы с i-м соседним выделом. Для приморских выделов вместо периметра берется протяженность сухопутной границы.

Эту формулу можно использовать и для контроля качества прогноза величин разнообразия, полученных в результате непосредственных вычислений. При раздробленности контура данного типа растительности, за основу берется величина разнообразия из известного выдела того же типа и корректируется по формуле.

Данный подход имеет ряд ограничений. В первую очередь, он совершенно не учитывает возможность нахождения на территории реликтовых или эндемичных видов и целых сообществ панцирных клещей. Правда, в условиях равнинного рельефа севера Европейской части России и отсутствия крупных физико-географических и биогеографических рубежей, погрешность от этого будет невелика.

Формула корректнее работает для выделов со слабоизрезанными границами, где отношение площади к периметру максимально, а также когда граничащие между собой выделы примерно равны по размерам.

Возможные источники погрешностей

Чрезвычайно важно правильно оценить степень изученности фауны. Если не учитывать, насколько качественно были проведены все этапы работ, и какие были допущены методические ошибки, то степень изученности будет зависеть от полноты обследования совокупности биотопов в пределах изучаемого ПТК и числа повторов отбора проб. При этом, в каждом конкретном случае необходимо решить, каким образом можно эффективнее обследовать территорию, отбирая пробы единовременно, что само по себе ценно, но во всех возможных биотопах, или проводя многократные сборы на ограниченном числе ключевых участков.

Это будет зависеть от того, какая сторона биологического разнообразия нас интересует. Если мы изучаем пространственную динамику биологического разнообразия, то необходим одновременный отбор в максимальном количестве мест. В случае если нас интересует общее совокупное биоразнообразие относительно небольшой и однородной в биоценотическом плане территории, то целесообразней отбирать пробы несколько раз, возможно, в течение нескольких сезонов.

Величины биологического разнообразия сообществ почвенных беспозвоночных будут зависеть не только от количества отобранных проб, качества их экстракции, но и в значительной степени от опытности исследователя. Важно понимать, что величина разнообразия будет напрямую определяться той таксономической снстемой, которая принята для того или иного исследования. Причем на видовом уровне различия будут не столь существенны, а на родовом уровне возможны значительные изменения, так как для многих групп почвенной фауны объем родов еще нельзя признать устоявшимся.

Если оценить видовую насыщенность орибатидами той или иной территории сравнительно просто, так как эта информация является качественной (есть вид, нет вида) н характернзуется при первом рассмотрении только одной цифрой - числом видов, то показатели биоразнообразия, основывающиеся на относительном обилин видов панцирных клещей в сообществах, учитывают несколько величин. Онн крайне чувствительны к погрешностям, которые возникают в результате применения той или иной методики сбора и обработки материала. Существует множество разных методов сбора н обработки фаунистического материала, описание которых приводится выше. Здесь мы лишь разделим их на группы:

1. Методы, применяемые при сборе первичного материала
2. Методы экстракции
3. Методы подсчета н определения видов.

Погрешность каждого конкретного метода избирательна по отношению к разным таксономическим группам и морфо-экологическим типам почвенных животных. Поэтому приходится с большой осторожностью относиться к данным по численности, например, панцирных клещей, представляемых различными авторами. Ценность таких сведений для сравнения населення панцирных клещей с увеличением числа регнонов снижается.

КАРТОГРАФИЧЕСКОЕ ОТОБРАЖЕНИЕ ДАННЫХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В БАЗЕ, И ИХ АНАЛИЗ

Данные о распространении отдельных видов и семейств различных групп почвенных обитателей, а также их разнообразия могут быть отображены на карте.

Удобиее всего для этого применять точечные карты, а для отображения экстраполированиых количествеиных показателей карты, построенные с использованием метода картодиаграмм или картограмм, а также количественного фоиа. Тренды измеиения биоразиообразия удобиее всего представлять методом изолиний.

Наложение двух или нескольких карт на компьютере и их синтезированиый вывод позволяет провести картографичекий аиализ зависимости распространеиия или интеисивиости выражеииости того или иного показателя сообществ панцирных клещей от распространения различиых природных факторов. Однако, всегда надо помнить, что совпадение распространения природного фактора с тем или иным показателем сообщества или ареалом таксона еще ие гарантирует определение второго первым. Такое совпадение может быть случайным или определяться действием некоего третьего фактора.

В таком случае бывает полезно провести проверку нашего предположеиия путем замены вида на другой со сходиой экологией и типом распространения, а также учетом действия иескольких факторов одновремеиио.

Очень часто граница ареала одного и того же вида иа разных ее участках будет зависеть от разных факторов. Классический тому пример, ограничеиие распространения множества видов животных иедостатком тепла иа севере и недостатком влаги на юге. Препятствием продвижеиию европейского вида на восток может быть континентальиость климата.

ЛИТЕРАТУРА

Аринушкииа Е.В. Руководство по химическому аиализу почв. М.: МГУ, 1970. 487 с.

Барнс Р., Кейлоу П., Олив П., Голдинг Д. Беспозвоночные. М.: Мир, 1992. 583 с.

Гиляров М.С. Зоологический метод диагностики почв. М.: Наука. 1965. 278 с.

Гиляров М.С., Стриганова Б.Р. (Ред.) Количествеиные методы в почвенной зоологии. М.: Наука, 1989. 288 с.

Грюнталь С.Ю. К методике учета жужелиц (Coleoptera, Carabidae) // Вестник зоологии. 1981. № 6. С. 63-66.

Давыдова М.И., Раковская Э.М., Тушинский Г.К. Физическая география СССР. Т. 1. Общий обзор. Европейская часть. Изд. 2. М.: Наука. 1989. 240 с.

Емец В.М. Пространственно-временная динамика разнообразия животного населения почв на рекреационно используемых и заповедных территориях (на примере крупных почвенных беспозвоночных Усманского бора). Воронеж: Изд-во ВГУ. 2002. 151 с.

Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам / В кн.: Фенетика популяций. М.: Наука. 1982. С. 38-44.

Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука. 2003. 347 с.

Зайцев А.С. Картографический анализ разнообразия панцирных клещей (Acariformes, Oribatida) равнинной части Европейской территории России. Автореф. дисс… канд. геогр. наук. М.: МГУ. 2002. 24 с.

Захаров В.М. Асимметрия животных (популяционно-фенетический подход). М.: Наука. 1987. 216 с.

Корганова Г.А. Раковинные амебы в почвах хвойно-широколиственных лесов как показатель особенности среды. Автореф. дисс…. канд. биол. наук. М.: ИЭМЭЖ. 1979. 16 с.

Криволуцкий Д.А., Чугунова М.Н., Гордеева Е.В., Тарба З.М. Фауна панцирных клещей (Acariformes, Oribatei) Московской и сопредельных областей / В кн.: Почвенные беспозвоночные Московской области. М. Наука. 1982. С. 55-71.

Криволуцкий Д.А. (Ред.) Панцирные клещи. М.: Наука, 1995. 224 с.

Криволуцкий Д.А., Зайцев А.С., Ласкова Л.М. География биоразнообразия панцирных клещей Европейского севера России. Петрозаводск: Изд-во Ин-та леса КНЦ. 1999. 36 с.

Криволуцкий Д.А., Покаржевский А.Д. Микробное звено в трофических цепях // Экология. 1988. № 5. С. 10-20.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1968. 288 с.

Мильков Ф.Н. Природные зоны СССР. М.: Мысль. 1977. 292 с.

Наумова Е.И. Функциональная морфология пищеварительной системы грызунов и зайцеобразных. М. Наука. 1981. 262 с.

Одум Ю. Основы экологии. М.: Мир. 1975. 740 с.

Песенко Ю.А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. М.: Наука. 1982. 288 с.

Покаржевский А.Д., ван Страален Н.М., Филимонова Ж.В., Зайцев А.С., Бутовский Р.О. Трофическая структура экосистем и экотоксикология почвенных организмов // Экология. 2000. № 3. С. 211-218.

Стриганова Б.Р. Питание почвенных сапрофагов. М.: Наука. 1980. 243 с.

Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука. 1990. 189 с.

Элтон Ч. Экология животных. М.-Л.: Биомедгиз. 1934. 82 с.

Alef K., Nannipieri P. (eds.) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London. 1995. 576 pp.

Arrhenius O. Influence of soil reaction of earthworms // Ecology. 1921. Vol. 2. P. 255-257.

Baars M.A. Catches in pitfall traps in relation to mean densities of carabid beetles. Oecologia. 1979. Vol. 41. P. 25-46.

Bobrov A.A., Charman D.J., Warner B.G. Ecology of Testate Amoebae (Protozoa: Rhizopoda) on Peatlands in Western Russia with Special Attention to Niche Separation in Closely Related Taxa // Protist. 1999. Vol. 150. P. 125-136.

Bobrov A.A., Mazey Yu. Morphological variability of testate amoebae (Rhizopoda: Testacea) in natural populations // Acta Protozool. (in press).

Chardez D. Thécamoebiens d'un article ancien, oublié méconnu // Revue Verviétoise d'Histoire Naturelle. 1985. Vol. 42. P. 13-16.

Chardez D., Delecour F. Thechnique d'isolement et de numeration des thecamoebiens du sol // Biol. Sol. 1970. Vol. 13. P. 49-50.

Coleman D.C., Crossley D. A. Fundamentals of soil ecology. Harcourt Publishers. 1996. 196 pp.

Couteaux M.-M. 1976. Dynamisme de l'equilibre des Thecamoebiens dans quelques sols climaciques // Memories du museum national d'histoire naturelle, Serie A, Zoologie, T. XCVI. 183 p.

Dalby P.R., Baker G.H., Smith S.E. "Filter paper method" to remove soil from earthworm intestines and to standardize the water content of earthworm tissue // Soil Biology and Biochemistry. 1996. Vol. 28. P. 685-687.

De Ruiter P.C., Neutel A.-M., Moore J.C. Modelling food webs and nutrient cycling in agroecosystems // Trends in Ecology and Evolution. 1994. Vol. 9. P. 378-383.

Degens B.P., Harris J.A. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities // Soil Biology and Biochemistry. 1997. Vol. 29. P. 1309-1320.

den Boer P.J. Dispersal power and survival. Carabids in a cultivated countryside. H.Veeman & B.W. Zonen. Wageningen. 1977. 190 pp.

Dick R.P. Soil enzyme activity as integrative indicators of soil health/ In: C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta (eds) Biological indicators of soil health. CABI, 1997. P. 121-156.

Giovannetti M., Mosse B. An evaluation of technique for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots // New Phytologist. 1980. Vol. 84. P. 489-500.

Heal O.W. 1965. Observations on testate amoebae (Ptotozoa: Rhizopoda) from Singly Island, South Orney Isiands // Brit. Antarct. Surv. Bull. Vol. 6. P. 43-47.

Heal O.W., Dighton, J. Resource quality and trophic structure in the soil system. In: A.H. Fitter, D. Atkinson, D.J. Read, M.B. Usher (eds.). Ecological interactions in soil. Blackwell, Oxford. 1985. P. 339-354.

Heal O.W., Maclean S.F., Jr. Comparative productivity in ecosystems - secondary productivity / In: Unifying concepts in ecology. Dr.W.Junk Publ, The Hague. 1975. P. 89-108.

Hunt H.W., Coleman D.C., Ingham E.R., Ingham R.E., Elliott E.T., Moore J.C., Rose S.L., Reid C.P.P., Morley C.R. The detrital food web in a shortgrass prairie // Biology and Fertility of Soils. 1987. Vol. 3. P. 57-68.

Ingham E.R., Trofymow J.A., Ames R.N., Hunt H.W., Morley C.R., Moore J.C., Coleman D.C. Trophic interactions and nitrogen cycling in a semi-arid grassland soil. I. Seasonal dynamics of the natural populations, their interactions and effects on nitrogen cycles // Journal of Applied Ecology. 1986 . Vol. 23. P. 597-614.

Jenkinson D.S. The determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil / In: Wilson J.R. (ed). Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems. CABI, Wallngford, 1988. P. 368-386.

Kempson D., Lloyd M., Ghelardi R. A new extractor for woodland litter // Pedobiologia. 1963. Vol. 3. P. 1–21.

Kormanik P.P., McGraw A.C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots / In: Schenk N.C. (ed.). Methods and principles of mycorrhizal research. Am. Phytopathological Soc., St. Paul, MN. 1982. P. 37–47.

Kratz W. The bait-lamina test – general aspects, applications and perspectives // Environmental Science and Pollution Research. 1998. Vol. 5. P. 94-96.

Meyer E. Functional activity of soil animals. / In: Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (eds). Methods in soil biology. Springer, Berlin, 1996. P. 362-363.

Nielsen C.O., Christensen B. The enchytraeidae. Critical revision and taxonomy of European species. Naturhistorisk Museum. Århus. 1959. 160 pp. Supplement 1 – 1961. 23 pp. Supplement 2 – 1963. 19 pp.

Niemela J., Halme E., Haila Y. Balancing sampling effort in pitfall trapping of carabid beetles // Entomologica Fennica. 1990. Vol. 1. P. 233-238.

Parkinson D. Filamentous fungi / In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (eds). Methods of soil analysis. Part 2. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. 1982. P. 949-968.

Parkinson D., Coleman, D.C. Microbial communities, activity and biomass // Agriculture, Ecosystems and Environment. 1991. Vol. 34. P. 3-33.

Persson T. (Ed.) Structure and function of nothern coniferous forests – an ecosystem study // Ecol. Bull. (Stockholm). 1980. V. 32. 610 p.

Pokarzhevskii A.D. The problem of scale in bioindication of soil contamination / In: D.A. Krivolutsky, N.M. van Straalen (eds.). Bioindicator systems for soil pollution. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1996. P. 111-121.

Pokarzhevskii AD, Van Straalen NM, Semenov AM Agar as a medium for removing soil from earthworm guts // Soil Biology and Biochemistry. 2000. Vol. 32. № 8-9. P. 1315-1317

Pokarzhevskii A.D., van Straalen N.M., Zaboev D.P., Zaitsev A.S. Microbial links and element flows in nested detrital food-webs // Pedobiologia. 2003. Vol. 47. P. 213-224.

Pokarzhevskii A.D., Zaboev D.P., Ganin G.N., Gordienko S.A. Amino acids in earthworms: are earthworms ecosystemivorous? // Soil Biology and Biochemistry. 1997. Vol. 29. P. 559-567.

Raw F. Estimation earthworm populations by using formalin // Nature. 1959. Vol. 184. P. 1661-1665.

Rowell M.J. Colorimetric method for CO2 measurement in soils // Soil Biology and Biochemistry. 1995. Vol. 27. P. 373-375.

Schauermann J. Verbesserte Extraktion der terrestrischen Bodenfauna im Vielfachgerät nach Kempson und Macfadyen // Mitteilungen SFB. 1982. Vol. 135. P. 47-50.

Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds.). Methods in soil biology. Springer Verlag, Berlin, 1996. 426 pp.

Schönborn W. Ermittung der Jahresproduction von Boden-Protozoen. 1. Euglyphidae (Rhizopoda, Testacea) // Pedobiologia. 1975. Bd. 15. S. 415-424.

Stevenson F.J., Cole M.A. Cycles of soil. John Wiley and Sons N.Y. 1999. 427 pp.

Tolonen K. Rhizopod analysis / In: Berglund B.E. (ed.). Handbook of Holocene palaeoecology and palaeohydrology. John Wiley, Chichester. 1986. P. 645-666.

van Straalen N.M., Rijninks P.C. The efficiency of Tullgren apparatus with respect to interpreting seasonal changes in age structure of soil arthropod populations // Pedobiologia. 1982. Vol. 24. P. 197-209.

Volz P. Untersuchungen über die Mikrofauna des Waldbodens // Zool. Jb. Syst. 1951. Vol. 79. P. 514–566.

von Törne E. Assessing feeding activities of soil-living animals. I. Bait-lamina-tests // Pedobiologia. 1990a. Bd. 34. S. 89-101.

von Törne E. Schätzungen von Fressaktivitäten bodenlebender Tiere II. Mini-Köder-Test // Pedobiologia 1990б. Bd. 34. S. 269-279.

Wardle D.A. Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices // Adv. Ecol. Res. 1995. Vol. 26. P. 105-185.

West A.W., Grant W.D., Sparling G.P. Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations // Soil Biology and Biochemistry. 1987. Vol. 19. P. 607-612.

Wiegert R.C., Coleman D.C., Odum E.P. Energetics of the litter-soil subsystem / In: Methods of study in soil ecology. Paris, IBP-UNESCO. 1970. P. 93-98.

Wu J., Joergensen R.G., Pommereining B., Chaussod R., Brookes P.C. Measurement of soil microbial biomass C – an automated procedure // Soil Biology and Biochemistry. 1990. Vol. 22. P. 1167-1169.

Zaitsev A.S., Berg M.P. Oribatid mites in different forest types in the Netherlands (Acari: Oribatida) // Nederlandse Faunistische Mededelingen. 2001. Vol. 15. P. 79-101.

Zelles L., Hund K., Stepper K. Methoden zur relativen Quantifizierung der pilzlichen Biomasse in Boden // Zeitschrift der Pflanzenernährung Bodenkunde. 1987. Vol. 150. P. 249-252.